



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Composición química, actividad antioxidante,
antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus* y efecto
fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial
de hojas de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez (junjulí)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Gina Rossmery DAMIÁN SANTA CRUZ

ASESORES

Dr. Américo Jorge CASTRO LUNA

Dra. Mirtha ROQUE ALCARRAZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Damián G. Composición química, actividad antioxidante, antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus* y efecto fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez (junjulí) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	—
DNI o pasaporte del autor	72677606
Código ORCID del asesor	0000-0001-8012-967X
DNI o pasaporte del asesor	25455526
Grupo de investigación	Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos naturales terapéuticos.
Agencia financiadora	-
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Lima, Perú -Departamento de Amazonas, Provincia de Luya en el Distrito de Camporredondo. Localidad Pillías. -Coordenadas: 06°09'07"S 078°21'05"W.
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2019
Disciplinas OCDE	Microbiología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Química Medicinal http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.06



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Composición química, actividad antioxidante, antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus* y efecto fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez (junjulí)

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

GINA ROSSMERY DAMIÁN SANTA CRUZ

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

APROBADO – SOBRESALIENTE – 18 (DIECIOCHO)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 15 de diciembre de 2020

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa

Presidente

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Composición química, actividad antioxidante, antimicrobiana sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> y efecto fungistático sobre <i>Candida albicans</i> del aceite esencial de hojas de <i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav) Mez (junjulí).
Área de investigación (*)	Ciencias de la Salud
Líneas de Investigación (*)	Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos naturales terapéuticos : (estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de su industrialización)
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	Departamento de Amazonas, Provincia de Luya en el Distrito de Camporredondo. Localidad Pillías (Coordenadas: 06°09'07"S 078°21'05"W).
Institución que financia si corresponde	NO APLICA
Año o rango de años que abarcó	Agosto 2018- Marzo 2020
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Damián Santa Cruz Gina Rossmery
Número de matrícula	13040101
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado del 2018
Código ORCID (opcional)	
DATOS DEL ASESOR I	
Apellidos y nombres	Castro Luna Américo Jorge
Código docente: 01432A Categoría: Principal Clase: D. E	
Máximo grado alcanzado	Doctorado (Dr. Farmacia y Bioquímica)
Código ORCID (obligatorio)	0000-0001-8012-967X
Título profesional	Químico Farmacéutico
Departamento Académico al que pertenece	Química Básica y Aplicada

Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”
Grupo de investigación al que pertenece, indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Recursos Naturales- RENATU / Coordinador del grupo de investigación
DATOS DEL ASESOR II	
Apellidos y nombres	Roque Alcarraz Mirtha
Código docente: 08560A Categoría: Principal Clase: D. E	
Máximo grado obtenido	Doctorado (Dr. Farmacia y Bioquímica)
Título profesional	Químico Farmacéutico
Código ORCID (obligatorio)	0000-0001-9154-5767
Centro laboral (si es que fuera externo a la UNMSM)	-
Departamento Académico al que pertenece	Microbiología y Parasitología Básica Aplicada
Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”
Grupo de investigación al que pertenece	Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”
Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Miembro

DEDICATORIA

En primer lugar, agradecer a Dios por cuidarme y guiar mis pasos, dándome sabiduría en las decisiones y acciones a realizar.

A mis padres: Mary y Américo, que con su gran amor y enseñanzas lograron hacer de mi una persona de bien, responsable y perseverante; y con su gran apoyo incondicional me acompañan en cada una de las etapas importantes de mi vida dándome las fuerzas y ánimos para seguir adelante ante cualquier dificultad.

A mi hermanita Lucero, por haber sido una pieza clave en concretar este trabajo de investigación al ayudarme a realizar la parte estadística y por estar siempre a mi lado en las dificultades y logros obtenidos.

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de mi alma mater, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; muchas gracias por la formación profesional brindada.

Al Dr. Américo Castro Luna, agradecerle el tiempo dedicado, enseñanzas y sugerencias brindadas; a mi coasesora, Dra. Mirtha Roque Alcarraz, agradecerle la guía y materiales brindados para desarrollar la presente tesis.

Al jurado calificador, agradecerle sus sugerencias y correcciones para reforzar el estudio realizado en la presente tesis.

Al Centro de Control Analítico (CCA) de CENPROFARMA de la UNMSM, por su ayuda en brindarme algunas cepas empleadas en el estudio.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	XVI
SUMMARY	XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS	4
3. OBJETIVOS	4
3.1. OBJETIVO GENERAL	4
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1. ASPECTO BOTÁNICO DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.....	5
4.1.1. Descripción morfológica	6
4.1.2. Hábitat y distribución geográfica	8
4.1.3. Uso en la medicina tradicional.....	9
4.2. Composición química.....	9
4.3. Propiedad antioxidante	15
4.3.1. Estrés oxidativo	15
4.3.2. Radicales libres.....	17
4.3.3. Sistemas antioxidantes	21
4.3.4. Compuestos bioactivos antioxidantes en plantas medicinales...	22
4.4. Actividad antimicrobiana	24
4.4.1. Infecciones ocasionadas por <i>Candida albicans</i>	25
4.4.2. Modos de acción de los aceites esenciales.....	27
4.4.3. Metabolitos antimicrobianos de los aceites esenciales	28
4.4.4. Ensayos para determinar la actividad antioxidante.....	31
4.4.5. Ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana	33

5. METODOLOGÍA	33
5.1. Tipo de investigación:	33
5.2. Lugar de realización de la investigación	33
5.3. Material vegetal	34
5.4. Obtención del aceite esencial	37
5.5. Determinación del rendimiento	38
5.6. Análisis preliminares	38
5.7. Identificación y cuantificación de la composición química mediante CG / EM	39
5.8. Evaluación de la actividad antioxidante	42
5.8.1. Ensayo de captación del radical DPPH	42
5.8.2. Ensayo mediante captación del radical ABTS •+	44
5.9. Microorganismos y condiciones de crecimiento	45
5.10. Evaluación de la actividad antimicrobiana	46
5.10.1. Método de difusión en agar	47
5.10.2. Método de microdilución colorimétrica en caldo	49
5.11. Evaluación del efecto fungistático	53
5.11.1. Método de difusión en agar	53
5.11.2. Método de microdilución colorimétrica en caldo	54
5.12. Análisis estadístico	57
6. RESULTADOS	58
6.1. Clasificación taxonómica	58
6.2. Datos de la zona de recolección	58
6.3. Análisis preliminares	59
6.3.1. Análisis organoléptico	59
6.3.2. Densidad	59
6.3.3. Ensayo de miscibilidad	60

6.4.	Composición química del aceite esencial de <i>P. caerulea</i>	60
6.5.	Actividad antioxidante de <i>P. caerulea</i>	71
6.6.	Actividad antimicrobiana de <i>P. caerulea</i>	74
6.6.1.	Actividad antimicrobiana mediante método de difusión en agar	74
6.6.2.	Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)	78
6.7.	Efecto fungistático de <i>P. caerulea</i>	80
6.7.1.	Efecto fungistático mediante método de difusión en agar	80
6.7.2.	Determinación de CMI por el Método de Microdilución colorimétrica en Microplaca	82
7.	DISCUSIÓN	84
8.	CONCLUSIONES	95
9.	RECOMENDACIONES	96
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
11.	ANEXOS	109

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras químicas y actividades biológicas de algunos componentes hallados en <i>Persea caerulea</i>	14
Tabla 2. Algunas características principales de las especies reactivas del oxígeno (EROS).	19
Tabla 3. Principales fuentes externas que incrementan la producción de ERO. ..	20
Tabla 4. Condiciones de operación del inyector Headspace.	40
Tabla 5. Condiciones de operación de inyección líquida.	41
Tabla 6. Preparación de tubos para la posterior lectura mediante método DPPH•	43
Tabla 7. Preparación de tubos para la posterior lectura mediante método de captación del radical ABTS ^{•+}	45
Tabla 8. Criterio de Evaluación de actividad antimicrobiana por método de difusión en agar.	49
Tabla 9. Ficha de recolección de "junjulí".	59
Tabla 10. Resultados de análisis de la densidad de <i>P. caerulea</i>	59
Tabla 11. Componente principal del aceite esencial de <i>Persea caerulea</i>	61
Tabla 12. Composición química del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> mediante análisis por Inyección Headspace.....	62
Tabla 13. Composición química del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> mediante análisis por Inyección Líquida.	65
Tabla 14. Comparación de actividad antioxidante del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> frente Trolox [®] expresada en concentración inhibitoria media IC ₅₀	71
Tabla 15. Cálculo del TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> determinado a partir del IC ₅₀	72
Tabla 16. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Persea caerulea</i> "junjulí" frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922 empleando el método de difusión en agar.....	75
Tabla 17. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Persea caerulea</i> "junjulí" frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923 empleando el método de difusión en agar.	75
Tabla 18. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> , expresado como concentración mínima inhibitoria (CMI).	78
Tabla 19. Actividad fungistática del aceite esencial de <i>Persea caerulea</i> "junjulí" frente a <i>C. albicans</i> ATCC 10231 empleando el método de difusión en agar.....	80

Tabla 20. Efecto fungistático del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> , expresado como concentración mínima inhibitoria (CMI).....	82
Tabla 21. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• del aceite esencial de <i>Persea caerulea</i>	117
Tabla 22. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• de Trolox®.....	117
Tabla 23. Porcentaje de inhibición de radicales ABTS•+ del aceite esencial de <i>Persea caerulea</i>	118
Tabla 24. Porcentaje de inhibición de radicales ABTS•+ de Trolox®.	118
Tabla 25. Descripción de las características fenotípicas de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especie vegetal <i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav.) Mez.	5
Figura 2. <i>Persea caerulea</i> (hojas y frutos).	6
Figura 3. Hojas de <i>Persea caerulea</i> extraídas por el recolector del pueblo.	7
Figura 4. Distribución de <i>Persea caerulea</i> en el Perú.	8
Figura 5. Estructuras químicas de los componentes (1-10) aislados de hojas de <i>P. caerulea</i>	11
Figura 6. Estructuras químicas de algunos componentes principales de los aceites esenciales.	12
Figura 7. Algunas estructuras químicas de (A) Monoterpenos, (B) Sesquiterpenos y (C) Diterpenos.	13
Figura 8. Relación entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), los niveles de antioxidantes (AO) y el estrés oxidativo.	16
Figura 9. Señalización redox y su relación con el estrés oxidativo.....	17
Figura 10. Esquema de producción de las EROS.	19
Figura 11. Constituyentes fenólicos y no fenólicos de aceites esenciales que presentan propiedades antioxidantes.	24
Figura 12. Morfología celular de <i>Candida sp.</i>	26
Figura 13. Estructuras químicas de algunos componentes seleccionados de aceites esenciales con actividad antimicrobiana.	30
Figura 14. Radical DPPH (como radical libre) y su forma estable.....	31
Figura 15. Reacción de ABTS (forma estable) y agente oxidante generando ABTS ^{•+} (como radical libre).	32
Figura 16. Radical ABTS ^{•+} (como radical libre) y su forma estable.	32
Figura 17. Extracción de las hojas de <i>Persea caerulea</i>	34
Figura 18. Selección de las hojas a trabajar de <i>Persea caerulea</i> para la obtención del aceite esencial.....	35
Figura 19. Flujograma de los ensayos que se realizaron a la muestra de <i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav) Mez (junjulí).....	36
Figura 20. Destilación por arrastre con vapor de agua para la obtención del aceite esencial.....	37
Figura 21. Obtención del aceite esencial..	38
Figura 22. Estructuras químicas de resazurina y resorufina.....	50

Figura 23. Diseño representativo del ensayo antimicrobiano en placa de microdilución de 96 pocillos del aceite esencial y del estándar de referencia.....	52
Figura 24. Diseño representativo del ensayo de efecto fungistático en placa de microdilución de 96 pocillos del aceite esencial y del estándar de referencia.....	56
Figura 25. Cromatograma de Gas por Inyección Headspace del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> “junjulí” de 3 a 120 minutos.	63
Figura 26. Primera parte del Cromatograma de Gas por Inyección Headspace del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> “junjulí” de 3 a 33 minutos.	63
Figura 27. Segunda parte del Cromatograma de Gas por Inyección Headspace del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> “junjulí” de 33 a 63 minutos.	64
Figura 28. Cromatograma de Gas por Inyección líquida del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> “junjulí” de 4 a 120 minutos.	68
Figura 29. Primera parte del Cromatograma de Gas por Inyección líquida del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> “junjulí” de 4 a 56 minutos.	68
Figura 30. Segunda parte del Cromatograma de Gas por Inyección líquida del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> “junjulí” de 56 a 109 minutos.	69
Figura 31. Distribución de las principales familias químicas de los componentes del aceite esencial de <i>P. caerulea</i>	70
Figura 32. Distribución de los diferentes grupos químicos de los componentes del aceite esencial de <i>P. caerulea</i>	70
Figura 33. Curva de captación del radical DPPH• del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> expresado en concentración con relación de su absorbancia.....	72
Figura 34. Curva de captación del radical ABTS ^{•+} del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> expresado en concentración con relación de su absorbancia.....	73
Figura 35. Curva de captación del radical DPPH• del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> expresado en concentración con relación de su %inhibición o %actividad antioxidante.....	73
Figura 36. Curva de captación del radical ABTS ^{•+} del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> expresado en concentración con relación de su %inhibición o %actividad antioxidante.....	74
Figura 37. Actividad antimicrobiana mediante método de difusión en agar del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> a diferentes porcentajes de concentraciones, contra <i>E. coli</i> ATCC 25922.	76

Figura 38. Actividad antimicrobiana mediante método de difusión en agar del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> a diferentes porcentajes de concentraciones, contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	77
Figura 39. Determinación de la CMI del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> y estándar de Amoxicilina por el método de microdilución colorimétrica contra cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	79
Figura 40. Efecto fungistático mediante método de difusión en agar del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> a diferentes porcentajes de concentraciones, contra <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	81
Figura 41. Determinación de la CMI del aceite esencial de <i>P. caerulea</i> y estándar de Fluconazol por el método de microdilución colorimétrica contra cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	83
Figura 42. Espectro de masa de la estructura alfa pineno.	112
Figura 43. Espectro de masa de la estructura beta pineno.	114
Figura 44. Espectro de masa de la estructura alfa felandreno.	116
Figura 45. Curva de captación del radical DPPH• de Trolox®.	119
Figura 46. Curva de captación del radical ABTS ^{•+} de Trolox®.	119
Figura 47. Planta "junjulí" tomada desde el lugar de recolección.	125
Figura 48. Batería de tubos del ensayo de miscibilidad del aceite esencial.	125
Figura 49. Batería de tubos para el ensayo de DPPH•.	126
Figura 50. Batería de tubos para el ensayo de ABTS ^{•+}	126
Figura 51. Discos de estándares para el método de difusión en agar.	127
Figura 52. Siembra del inóculo para el método de difusión en agar.	127
Figura 53. Reactivos empleados en el ensayo de microdilución colorimétrica.	128
Figura 54. Homogenización para preparación de la muestra de aceite esencial con DMSO.	128
Figura 55. Cabina de flujo laminar con materiales a usarse para el ensayo de microdilución colorimétrica.	129
Figura 56. Batería de tubos para el ensayo de microdilución colorimétrica.	129

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABTS●+	: Ácido 2,2'-azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6- sulfónico (radical catiónico)
AE	: Aceite esencial
ATCC	: Colección Americana de Cultivos Tipo - <i>American Type Culture Collection</i>
BHA	: Butilhidroxianisol
BHT	: Butilhidroxitolueno
IC₅₀	: Concentración inhibitoria media - <i>Half inhibitory concentration</i>
CAT	: Catalasa
CLSI	: Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico - <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
MIC	: Concentración mínima inhibitoria - <i>Minimum inhibitory concentration</i>
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DPPH●	: 2,2-difenil-1 picrilhidrazilo (Radical)
EO	: Estrés Oxidativo
EUCAST	: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana - <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ER	: Especies reactivas
FDA	: Administración de alimentos y medicamentos - <i>Food and Drug Administration</i>
GC/EM	: Cromatografía de gases/espectrometría de masas
GPx	: Glutación peroxidasa
GST	: Glutación - S - transferasa
LABICER	: Laboratorio de Investigación y Certificaciones
MTT	: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
PG	: Propil galato

Prx	: Peroxirredoxina
ROS	: Especies reactivas de oxígeno (ERO) - <i>Reactive oxygen species</i>
RNS	: Especies reactivas de nitrógeno – <i>Reactive nitrogen species</i>
RL	: Radicales libres
SOD	: Superóxido dismutasa
TBHQ	: Terbutil hidroquinona
TEAC	: Capacidad antioxidante equivalente a Trolox - <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TROLOX	: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
USP	: Farmacopea de los Estados Unidos - United States Pharmacopeia

RESUMEN

Debido a los escasos estudios realizados del género *Persea* se considera importante realizar nuevos aportes sobre esta especie, que tiene como finalidad contribuir en el conocimiento de nuevos agentes con actividades terapéuticas demostradas y poderse usar como una alternativa de medicina natural, reemplazando así el uso de medicamentos sintéticos que pueden producir toxicidad y resistencia microbiana en su uso irracional y prolongado; por lo tanto, se ha considerado trascendente estudiar el aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez "junjulí" con el objetivo de evaluar la composición química, la actividad antioxidante, antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus*; y efecto fungistático sobre *Candida albicans*. Las hojas recolectadas de la Provincia de Luya, Departamento de Amazonas. El aceite esencial fue obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de agua, se procedió luego a realizarse los ensayos de miscibilidad y determinación de la densidad. Se halló la composición química del aceite esencial mediante Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), identificando como componentes mayoritarios a los monoterpenos: alfa-pineno, beta-pineno y alfa felandreno. La actividad antioxidante se evaluó por el método de captación de radicales (radical DPPH• y radical ABTS**), los resultados se expresaron mediante el valor IC₅₀ (10613,965 µg/mL y 1288,415 µg/mL respectivamente); mostrando baja actividad antioxidante a comparación de los valores IC₅₀ del estándar Trolox® (2,504 µg/mL y 3,053 µg/mL respectivamente). La actividad antimicrobiana y efecto fungistático se evaluó previamente por el método de difusión en agar, no mostrando actividad frente a *E. coli* y demostrando actividad antimicrobiana y antifúngica frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *C. albicans* ATCC 10231, respectivamente, a concentraciones desde 75%; se procedió con dichas cepas por el método de microdilución colorimétrica para determinar la CMI. El aceite esencial presentó una baja actividad antimicrobiana (CMI, 8,71 mg/mL) frente a *S. aureus* comparado con Amoxicilina (CMI, 0,25 µg/mL); y bajo efecto fungistático (CMI, 34,84mg/mL) comparado con Fluconazol (CMI, 64 µg/mL). En conclusión, los valores de actividad antioxidante, actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus* y el efecto fungistático del aceite esencial de *P. caerulea* resultaron bajos, sin embargo, su gran contenido de componentes monoterpenos lo hace interesante para futuras investigaciones de otras propiedades farmacológicas que se le atribuye a dichos componentes.

Palabras clave: Composición química, antioxidante, difusión en agar, CMI, microdilución colorimétrica, *E. Coli*, *S. aureus*, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Due to the few studies carried out on the genus *Persea*, it's considered important to make new contributions on this specie, which aims to contribute to the knowledge of new agents with proven therapeutic activities and to be able to be used as a natural medicine alternative, thus replacing the use of synthetic drugs that can produce toxicity and microbial resistance in their irrational and prolonged use; in this context, it has been considered transcendent to study the essential oil of *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez "junjulí" in order to evaluate the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity on *E. coli* and *S. aureus*; and fungistatic effect on *Candida albicans*. The leaves were collected in the Province of Luya, Department of Amazonas. The essential oil was obtained by steam distillation, the miscibility tests and density determination were then carried out. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography / mass spectrometry (GC / MS), identifying the major components of the monoterpenes: alpha-pinene, beta-pinene and alpha felandrene. The antioxidant activity was evaluated by the method of radical scavenging (DPPH• radical and ABTS^{•+} radical), the results were expressed by the IC₅₀ value (10613,965 µg / mL and 1288,415 µg / mL respectively); showing low antioxidant activity compared to the IC₅₀ values of the Trolox[®] standard (2,504 µg / mL and 3,053 µg / mL respectively). The antimicrobial activity and fungistatic effect was previously evaluated by the agar diffusion method, showing no activity against *E. coli* and demonstrating antimicrobial and antifungal activity against *S. aureus* ATCC 25923 and *C. albicans* ATCC 10231, respectively, at concentrations from 75%, these strains were proceeded by colorimetric microdilution method to determine the MIC. The essential oil showed no significant activity against *E. coli*, low antimicrobial activity (MIC, 8.71 mg / mL) versus *S. aureus* compared to Amoxicillin (MIC, 0.25 µg / mL); and low fungistatic effect (MIC, 34.84mg / mL) compared to Fluconazole (MIC, 64 µg / mL). In conclusion, the values of antioxidant activity, antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* and the fungistatic effect of the essential oil of *P. caerulea* were low, however, the high content of monoterpene components makes it interesting for future investigations of other pharmacological properties attributed to these components.

Keywords: Chemical composition, antioxidant, agar diffusion, MIC, colorimetric microdilution, *E. Coli*, *S. aureus*, *Candida albicans*.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales se caracterizan por poseer principios activos que pueden modificar el funcionamiento de los sistemas biológicos alterándolos o restableciendo el equilibrio funcional orgánico¹. Los aceites esenciales provenientes de las plantas presentan diversos fines que se ven reflejadas en propiedades como: antiinflamatorias, afrodisíacas, antisépticas, antidepresivas, etc., que están presentes en diversos grados en la totalidad de los aceites². Los bioactivos presentes en los aceites esenciales presentan diversas propiedades como la antioxidante, antimicrobiana y/o antifúngica³, por lo que de acuerdo con los componentes químicos y bioactividad que éstos presenten, determinarán el valor económico y la aplicabilidad industrial de los AE⁴. Así mismo Hossein P, Khaleghi M. y Gorji A. afirman que algunos aceites esenciales parecen exhibir propiedades medicinales particulares que curan una u otra disfunción orgánica o trastorno sistémico⁵.

Actualmente existe un incremento en la atracción de los aditivos naturales como antioxidantes potenciales para fines en la industria alimentaria y/o cosmética con el fin de reemplazar a los aditivos químicos, por lo cual en los últimos años han sido tema de análisis muchas fuentes vegetales. La facultad de regularizar las alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres (RL), forma una de las propiedades antioxidantes de diversas plantas aromáticas, ganando la atracción de muchos grupos de investigación³. Así también el de resguardar a las células frente al daño oxidativo, que provoca envejecimiento y la ocurrencia de enfermedades crónico-degenerativas, tales como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer; dichos antioxidantes preservan la salud previniendo enfermedades que son ocasionadas por oxidación de lípidos, y en alimentos, retardando la creación de productos tóxicos y manteniendo su calidad nutritiva⁴.

Antioxidantes sintéticos, como el Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Propil galato (PG) y Terbutil hidroquinona (TBHQ), se han utilizado como compuestos potentes en la conservación de alimentos durante décadas debido a su bajo costo y sabor suave. Sin embargo, su consumo se ha reducido debido a

que los consumidores prefieren el uso de ingredientes naturales. Además, se han planteado problemas de seguridad con respecto a los antioxidantes sintéticos y su uso está limitado y regulado por la FDA⁶, debido a que dosis por encima de lo permitido pueden generar efectos tóxicos; tales como la citotoxicidad de BHA y BHT encontrado en líneas celulares de leucemia promielocítica humana (HL-60) y líneas celulares de carcinoma escamoso, lo que ha provocado la necesidad de explorar fuentes alternativas de antioxidantes naturales y probablemente más seguras y efectivas⁷.

Debido a ello surge necesidad de investigar productos naturales que presenten gran contenido de antioxidantes que puedan usarse para prevenir y tratar trastornos relacionados con el estrés oxidativo y también ser usados en los productos alimenticios contra el deterioro oxidativo. Existe un amplio porcentaje de estudios de actividad antioxidante a partir de los aceites esenciales; sin embargo, sólo se representa que un 3.4% del género *Persea* presentan estudios por su actividad antioxidante; debido a ello; se considera importante realizar más aportes importantes al conocimiento sobre este género *Persea* con respecto a estudios de actividad antioxidante⁸.

Asimismo, en estudios últimos se han demostrado la actividad antibacteriana de diversos aceites esenciales, los cuales pueden contener más de 150 componentes⁹. Gran cantidad de estudios han determinado que los aceites esenciales son efectivos frente a numerosas bacterias no patógenas y patógenas, así también contra levaduras y mohos, incluidos algunos mohos productores de micotoxinas, esta efectividad de los aceites esenciales se da en su fase vapor y por contacto directo. Investigaciones recientes realizadas por F. Reyes, E. Palou y A. López-Malo menciona que los componentes químicos presentes en los aceites esenciales, como los monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos, están posiblemente relacionados con atribuir las propiedades antimicrobianas, propiedades aromáticas y antioxidantes de los aceites esenciales¹⁰.

En un panorama actual, en las industrias utilizan a los parabenos como conservantes puesto que tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, principalmente contra los mohos, levaduras y microorganismos gram-positivos; no obstante, algunas investigaciones indican que pueden ejercer actividad como

disruptores endocrinos, ya que presentan actividades estrogénicas¹¹, por lo mencionado se genera entonces la exigencia de buscar alternativas para la conservación con propiedades antimicrobianas y que a su vez tenga compatibilidad con el alimento. Son escasos los estudios relacionados con la propiedad antimicrobiana de AE aplicados en alimentos o sistemas modelo de alimentos; sin embargo, en estudios realizados con algunos aceites esenciales, obtuvieron como resultados un aumento en la vida útil de ensalada de frutas y reducción en su carga microbiana, además de ello no se alteró las características sensoriales del producto¹².

El incremento en la ocurrencia de infecciones conlleva a un crecido uso de antimicrobianos y, por consecuente, a que exista una alta presión selectiva en favor de los microorganismos resistentes¹³, además se menciona en el artículo de Reta A, et. al. que los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) declararon que la resistencia a los antibióticos es responsable de alrededor de 2 millones infecciones y los datos de ventas farmacéuticas sobre el consumo mundial de antibióticos (2000-2010) revelan que el consumo total de antibióticos aumentó en más de 30%¹⁴. A su vez, la dispersión universal de microorganismos resistentes y enfermedades infecciosas se ha acelerado debido a la propagación en el comercio mundial y viajes¹³. En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacología, logrando encontrar nuevas moléculas¹⁵; tal es el caso del estudio al aceite esencial de hojas de *Persea caerulea*.

Es bien sabido que el Perú es un país mega biodiverso ya que la variedad vegetal llega alrededor de unas 50 000 especies detectadas, por estas razones debemos maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, que previamente con sus respectivos estudios han sido validados científica y tecnológicamente⁹.

Con el fin de aportar al potencial terapéutico que presentan las especies de la Familia Lauraceae; en este contexto, se ha considerado la importancia de estudiar el aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “junjulí”. La presente investigación tiene como finalidad contribuir en el conocimiento de recursos

naturales usados como nuevos agentes que presenten actividades terapéuticas demostradas , ya que además no se tiene suficientes investigaciones relacionadas a sus actividades terapéuticas en el Perú que permitan validar sus aplicaciones ancestrales como antiinflamatorio de las vías reproductoras y urinarias, cefalalgia, entre otras; y se puedan usar posteriormente como una alternativa de medicina natural, reemplazando así el uso de medicamentos de síntesis que pueden producir toxicidad y resistencia microbiana en su uso irracional y prolongado.

2. HIPÓTESIS

Los componentes químicos del aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “junjulí” tienen actividad antioxidante, actividad antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus* y efecto fungistático sobre *Candida albicans*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición química, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus*; y el efecto fungistático frente a *Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* “junjulí”.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los componentes químicos del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* “junjulí” mediante cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG / EM).
- Evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* “junjulí”.
- Evaluar la actividad antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus* del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* “junjulí” y posterior determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- Evaluar el efecto fungistático frente a *Candida albicans* del aceite esencial de *Persea caerulea* “junjulí” y determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

4. MARCO TEÓRICO

4.1. ASPECTO BOTÁNICO DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

Nombres vulgares o común¹⁶: “junjulí”, “pumapara”, “aguacatillo”, “negrillo”.

Sinónimos: *Laurus caerulea* Ruiz & Pav; *Persea laevigata* Kunth; *Persea laevigata* var. *caerulea* Meisn.; *Persea lignitepala* Lasser; *Persea petiolaris* Kunth.; *Persea skutchii* C.K. Allen; entre otros^{16,17}.

Etimología: El nombre *Persea caerulea* proviene de los siguientes orígenes: “*Persea*”, nombre utilizado por Teofrasto en honor a Perseo (semidios de la mitología griega), para designar un árbol de oriente; y “*caerulea*”, del latín *caeruleatus*, que significa teñido de azul¹⁸.

Una ficha del herbario de la especie vegetal de *Persea caerulea* recolectada de Amazonas, Distrito de Chachapoyas¹⁷ se muestra en la Figura 1.

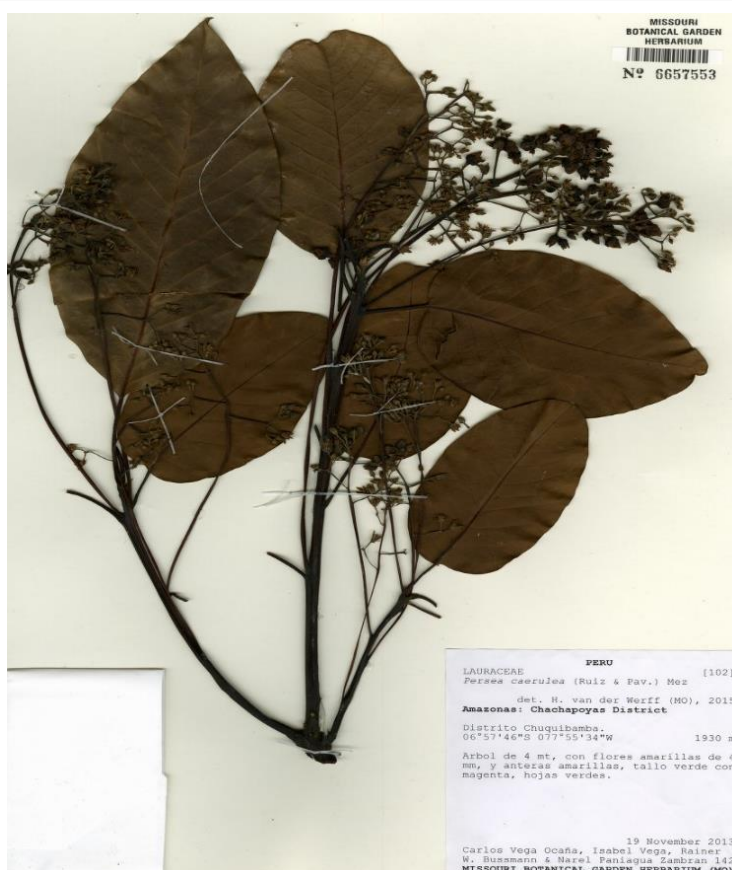


Figura 1. Especie vegetal *Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez.

Fuente: Missouri Botanical Garden Herbarium¹⁷.

4.1.1. Descripción morfológica

Persea caerulea (Ruiz & Pav.) Mez, son árboles entre medianos a grandes con una altura de hasta 25 m, las ramas tienen sección transversal angular, con tricomas blanquecino a amarillentos, lisos, adpresos a ascendentes, con cobertura laxa a medianamente densa. Peciolos de 2 a 7 cm de largo, las hojas se encuentran distribuidas a lo largo de las ramas y son glabras con el haz de color verde oscuro brillante, y el envés es de un tono verde pálido amarillento; láminas foliares ovadas a elípticas, ápice agudo a acuminado, cuneada, ligeramente cordada o desigual^{16,19}, tiene nerviación pinnada, con nervaduras secundarias arqueadas y divididas antes del margen. Flores presentan un diámetro de 5,0-6,0 x 8,0 mm, son pequeñas, amarillentas y aromáticas¹⁶.

Las inflorescencias son panículas axilares, de ejes pubescentes y tonalidad rojiza. Los frutos son bayas globosas o deprimido-globosas, uniseminadas de hasta 5mm de diámetro, presenta un color verde azulado cuando madura¹⁶; tépalos parcialmente caducos, pubescentes; estambres persistentes en el fruto¹⁹. Las semillas son de color crema muy claro, de forma casi esférica y tonalidades amarillas a verdes, con consistencia suave y superficie lisa¹⁶.

Se muestran en la Figura 2 la morfología de las hojas y frutos extraídas del catálogo virtual de flora de Colombia¹⁸, mostrándose morfológicamente iguales a las hojas recolectadas en Amazonas por el recolector del pueblo (Figura 3) para este trabajo de investigación.



Figura 2. *Persea caerulea* (hojas y frutos)¹⁸.



Figura 3. Hojas de *Persea caerulea* extraídas por el recolector del pueblo.

Fuente: propia del autor.

Se le reconoce por la longitud de los tépalos, donde los externos son cuatro veces más cortos que los internos. Los pedúnculos no se engrosan durante la fructificación y mientras el fruto va madurando, éstos se fracturan y caen, quedando de longitud similar a los externos¹⁹.

La manera de florecer es en forma sincrónica durante los meses de enero y marzo, que coincide con la estación de mínima precipitación. Algunos presentan un ligero florecimiento entre agosto a octubre. Después de dos meses del florecimiento, se observan la mayor cantidad de frutos principalmente de marzo a julio. Ésta especie en estudio es del tipo caducifolia, si bien algunos individuos no pierden las hojas masivamente, la regeneración del follaje es persistente; durante los dos primeros meses del año se lleva a cabo la máxima pérdida de hojas¹⁶.

4.1.2. Hábitat y distribución geográfica

La planta estudiada pertenece a la familia Lauraceae, y se encuentra extendida sobre latitudes tropicales y subtropicales, engloban un total de 2500 - 3000 especies que se encuentran agrupadas en 50 géneros. En las zonas de Indomalaya, América del sur y central, son los principales centros de diversidad donde podemos encontrar a la familia Lauraceae²⁰.

El género *Persea*, perteneciente a la familia Lauraceae, comprende alrededor de 190 especies, que se encuentran distribuidas principalmente en Mesoamérica, Sudamérica y el sudeste asiático. Este género se divide en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne*. La especie *P. caerulea* es un árbol ampliamente distribuido (500 - 2000 msnm) desde bosques de tierras bajas a premontanos en Mesoamérica y Sudamérica, principalmente en Colombia, Bolivia, Ecuador, Perú y Venezuela²¹. Así también *Persea caerulea* ha sido reportada comenzando en Honduras hasta Bolivia, con excepción de Brasil. Esta especie puede hallarse al interior de los bosques nublados y a lo largo de áreas intervenidas como carreteras y potreros, considerada como una especie pionera de los estratos arbóreos de una vegetación secundaria que crece en climas cálidos-húmedos¹⁹.

En el Perú, se reportó el crecimiento de la especie en los siguientes departamentos : Huánuco, Cajamarca, Pasco, Cuzco, Amazonas, San Martín, Junín y Piura; a una altura desde 500-1000, 1000-1500, 1500-2000 m.s.n.m¹⁷.

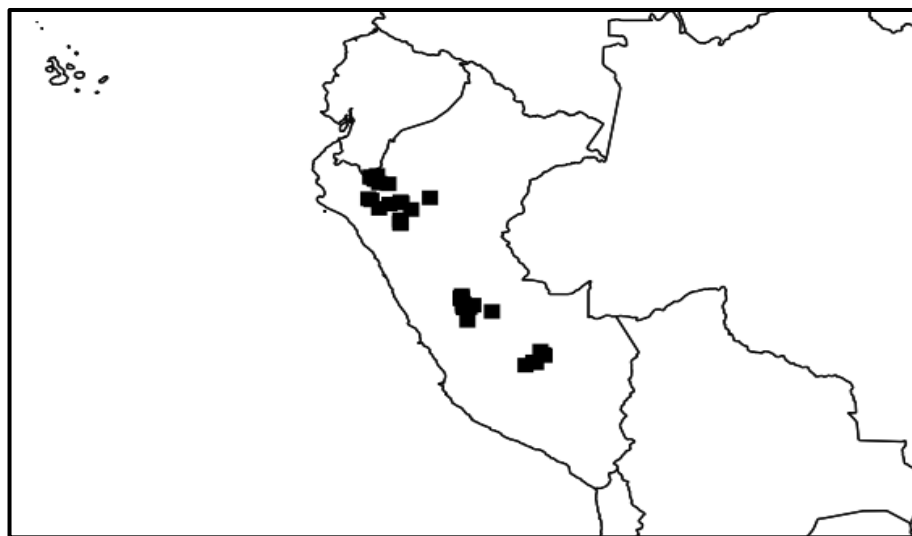


Figura 4. Distribución de *Persea caerulea* en el Perú¹⁷.

4.1.3. Uso en la medicina tradicional

La familia Lauraceae, presenta un gran atractivo económico como aceites esenciales, productores de especias, frutos comestibles o en algunos casos como maderables. Así mismo se le reconoce a nivel mundial por sus diversos usos en medicina ancestral, de los cuales los más relevantes son como carminativo, diurético, antiespasmódico, vermífugo, para tratamiento de picaduras de insectos, emenagogo, etc.²⁰. Esta familia constituye una colección vegetal de alta trascendencia económica y ecológica, el aguacate (*Persea americana* Mill.) reconocido por sus grandes frutos comestibles y el aguacatillo o junjulí (*Persea caerulea*) es ampliamente utilizado en medicina alternativa por sus propiedades sedantes, son los principales representantes de esta familia¹⁹.

Los miembros del género *Persea* se han usado principalmente en medicina tradicional para tratar enfermedades como: hipertensión, diarrea, enfermedades infecciosas, antiinflamatorios y analgésico gástrico²¹.

Los frutos del aguacatillo o junjulí (*Persea caerulea*) son frecuentemente empleados para obtener potentes sedantes que pueden emplearse como veneno contra perros y ratas¹⁹.

4.2. Composición química

Los vegetales o plantas medicinales son altamente valiosos por su potencial terapéutico ya que a una amplia variedad se le atribuye el contenido de componentes fitoquímicos activos. Entre los más conocidos compuestos bioactivos tenemos a los polifenoles, monoterpenos, fitoestrógenos, isoprenoides, entre otros²².

De esta forma una amplia investigación ha llevado que se realice la caracterización e identificación de los componentes primordiales de los AE, que debido a su acción antimicrobiana de amplio espectro son de gran importancia para las industrias cosmética y farmacéutica. Los aceites esenciales pueden constituir de 20 a 100 metabolitos secundarios de diferentes plantas que pertenecen a una variedad de clases químicas²³.

Una de las familias de plantas bien conocidas y ricas por producir aceites esenciales con valor medicinal e industrial es la familia Lauraceae; ricos en terpenoides²³. El género *Persea*, debido a su variedad de uso etnobotánico, ha generado interés en la investigación de metabolitos para validar sus usos, llegando a aislar diversos compuestos como: terpenos, flavonoides, ácidos abscísicos, lignanos entre otros. Así en el extracto de hojas de *P. caerulea*, se identifica gran número de metabolitos con importancia por presentar actividad acaricida contra *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*; esto podría estar relacionada a la presencia de compuestos polihidroxilados, alquilfuranos y hidroxioalquilacetatos²⁴.

Álvarez J, et al. aisló y elucidó diez compuestos del extracto etanólico de las hojas de *Persea caerulea*, incluidos cinco flavonoides (1-5), dos cumarinas (6-7) y tres esteroides (8-10). Sus estructuras se muestran en la [Figura 5](#) y entre ellos tenemos : quercetina (1), kaempferol-3-O- α -l- ramnopiranosido (2), kaempferol-3-O- α -l-arabinofuranosido (3), quercetin-3-O- α -l-ramnopiranosido (4), quercetina-3-O- β -glucósido (5), escopoletina (6), isofraxidina (7) campesterol (8), estigmasterol (9) y β -sitosterol (10)²¹.

Álvarez JC. realizó un estudio químico sobre los aceites esenciales de las hojas de *P. caerulea* donde observó que los sesquiterpenos fueron los componentes en mayor proporción con alrededor del 60% de la composición química, mientras que los monoterpenos solo representaron el 16% del total. De las 55 sustancias identificadas en el aceite esencial de hojas de *P. caerulea*, los componentes mayoritarios fueron: sesquiterpenos β -farneseno con un 38.90%, β -cariofileno con 35.64%, espatulenol con un 28.35% y el monoterpeno sabineno representó el 23.13%. Siendo los compuestos β -cariofileno y sabineno los que se diferenciaron entre el periodo y los lugares de colecta. Mientras que, en otro estudio parecido, obtuvieron como componentes principales al germacreno D y los sesquiterpenos β -cariofileno; dichos análisis mencionados se realizaron mediante CG-EM²⁰. Se elaboró la Tabla 1 con las estructuras químicas y actividades biológicas extraídas de diversas fuentes bibliográficas que son atribuidas a los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Persea caerulea*.

Generalmente, los componentes químicos principales de un aceite esencial determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales, donde el grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides y el otro de aromáticos y constituyentes alifáticos (Figura 6)²⁵.

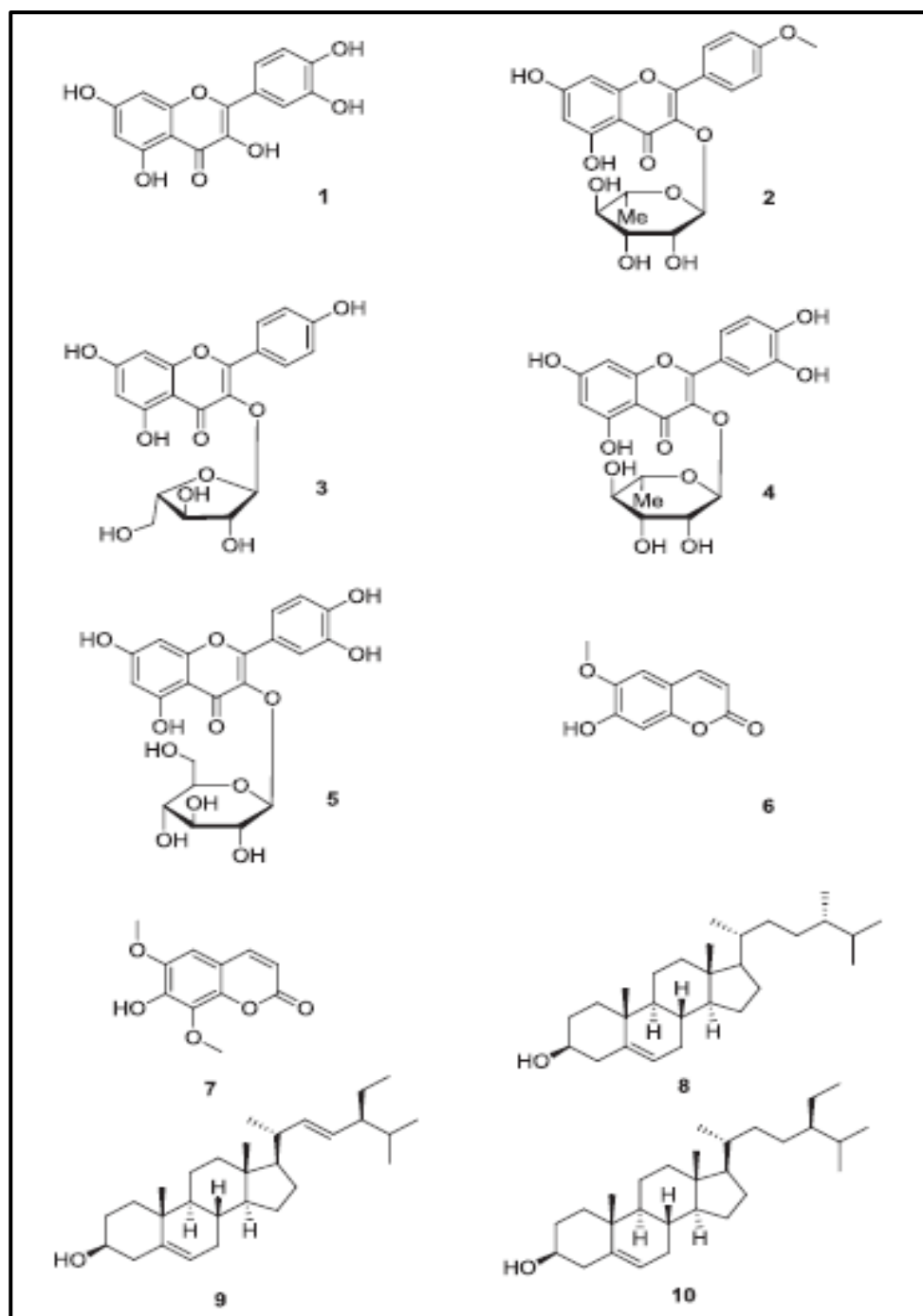


Figura 5. Estructuras químicas de los componentes (1-10) aislados de hojas de *P. caerulea*²¹.

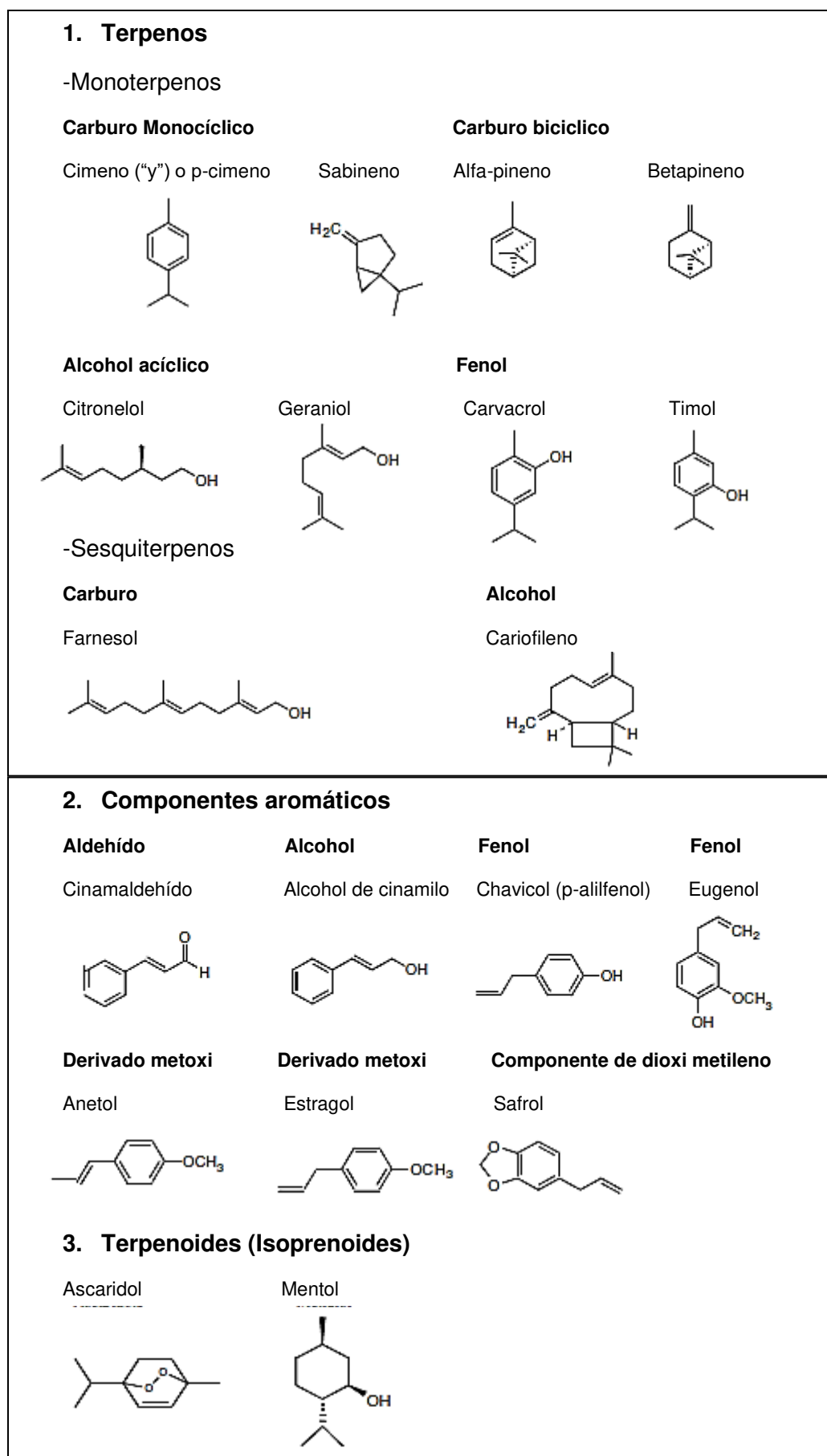


Figura 6. Estructuras químicas de algunos componentes principales de los aceites esenciales²⁵.

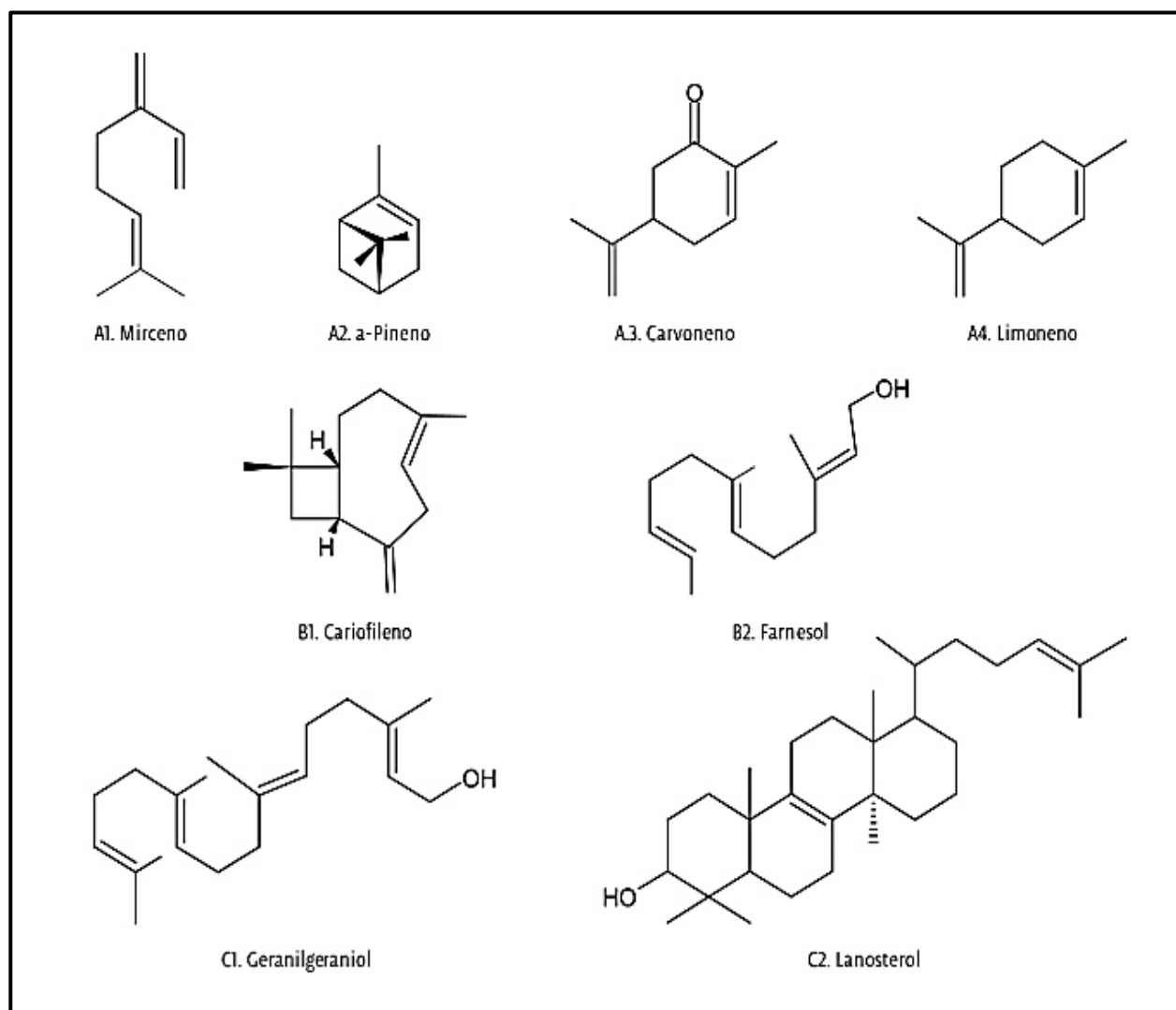
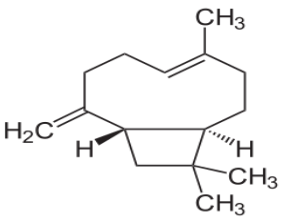
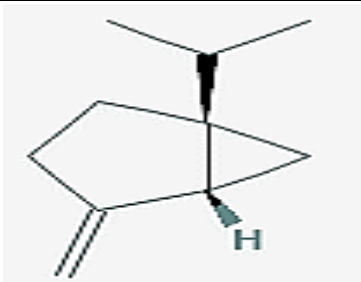
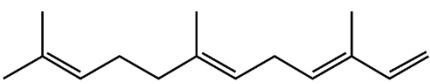
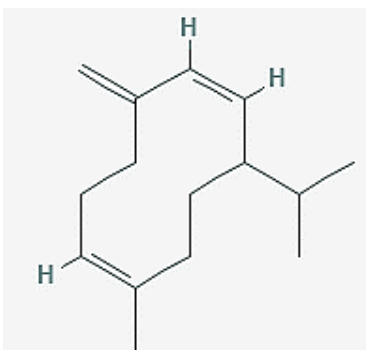
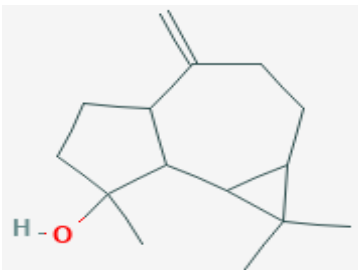


Figura 7. Algunas estructuras químicas de (A) Monoterpenos, (B) Sesquiterpenos y (C) Diterpenos¹⁰.

Tabla 1. Estructuras químicas y actividades biológicas de algunos componentes hallados en *Persea caerulea*.

MOLECULAS	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	REFERENCIAS
 <p>β-cariofileno</p>	<p>Antiinflamatoria, analgésica, antipirética, antibacteriana.</p>	<p>26 – 28</p>
 <p>Sabineno</p>	<p>Antibacteriana, antifúngica y antiinflamatoria.</p>	<p>28 – 30</p>
 <p>Beta- farneseno</p>	<p>Efecto repelente, insecticida y aficida.</p>	<p>31 – 33</p>
 <p>Germacreno- D</p>	<p>Insecticida, repelente, antimicrobiana y anticancerígeno en algunas líneas celulares</p>	<p>27, 34, 35</p>
 <p>Espatulenol</p>	<p>Antiinflamatoria, antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> y <i>Proteus Mirabilis</i></p>	<p>36 – 38</p>

Elaboración: Propia

4.3. Propiedad antioxidante

4.3.1. Estrés oxidativo

Es definido a modo de "*un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes*", lo que lleva a un obstáculo en el control redox, la señalización y / o daño molecular³⁹.

La gran cantidad de conocimiento sobre señalización redox alimentó la actividad de investigación sobre el papel del estrés oxidativo, clasificándose según su intensidad que van desde el estrés oxidativo en condiciones fisiológicas normales hasta que una exposición oxidativa suprafisiológico conduce a una señalización redox interrumpida y daño de biomoléculas, con posteriores consecuencias fisiopatológicas (peligro oxidativo)³⁹.

Los efectos del EO dependen del grado que presentan estos cambios, cuando se presentan sólo pequeñas perturbaciones a nivel celular, la célula puede superar y restablecerse a su estado original; sin embargo, cuando el EO es moderado puede producir muerte celular pudiendo desencadenarse una apoptosis, que a su vez se puede convertir en necrosis si es que el EO llega a ser intensa⁴⁰.

Durante la última década se piensa que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de varios tipos de enfermedades por lo que las investigaciones indican que aún no está claro si los síntomas de una enfermedad se producen por los oxidantes o si se producen como consecuencia de esta⁴⁰. La condición de una excesiva producción de moléculas de gran inestabilidad (radicales libres) que supere los niveles fisiológicos normales, se denomina estrés celular y dan como resultado numerosas patologías como: respiratorias, gástricas, óseas, cardíacas, entre otras⁴¹.

El estrés celular se puede presentar debido a situaciones como: incremento en la producción de las especies reactivas (ER), disminución en los niveles de las defensas antioxidantes celulares, o puede ser ambas condiciones en algunas situaciones, trayendo como consecuencia daños celulares irreparables⁴¹. Ya que se generan constantemente los agentes pro-oxidantes, es nada probable que el valor de estrés oxidativo sea nulo y, por consiguiente, continuamente se está generando en el organismo algunos valores de daño oxidativo. Si el aumento de

ROS es pequeño, se puede asemejar con el incremento de los niveles antioxidantes. No obstante, un aumento constante de niveles de ROS puede llevar a un constante aumento en los niveles base de antioxidantes en el cuerpo, resultando más sencillo nivelar posteriores periodos oxidativos (figura 8)⁴².

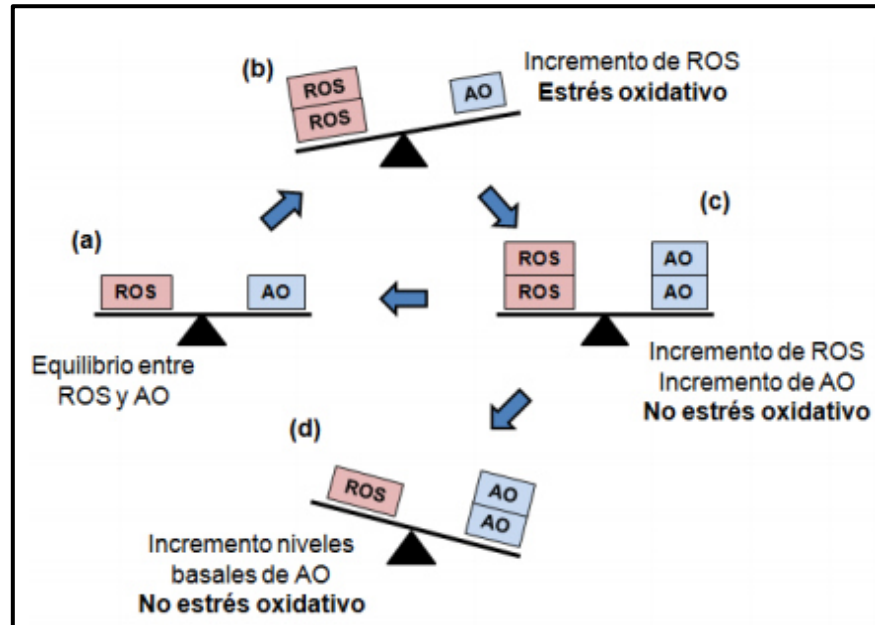


Figura 8. Relación entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), los niveles de antioxidantes (AO) y el estrés oxidativo⁴².

Para evitar que se produzca un aumento y propagación de patologías anteriormente mencionadas que se encuentren asociadas al estrés oxidativo, se han empezado a diseñar estrategias terapéuticas que ayuden a conservar y restaurar el nivel entre las sustancias antioxidantes y oxidantes⁴¹.

4.3.2. Radicales libres

Los componentes de un organismo vivo en su metabolismo aeróbico normal están sujetos a una exposición constante de especies redox u oxidantes. Las fuentes pueden dividirse en sitios endógenos y exógenos. Los factores de estilo de vida pueden incidir en ambos tipos de fuentes³⁹.

Una idea importante, desde el principio, fue la percepción de que las reacciones de oxidación-reducción (redox) en las células vivas se utilizan en procesos fundamentales de regulación redox, denominados colectivamente “Señalización redox” (figura 9) y “control redox”^{39,43}.

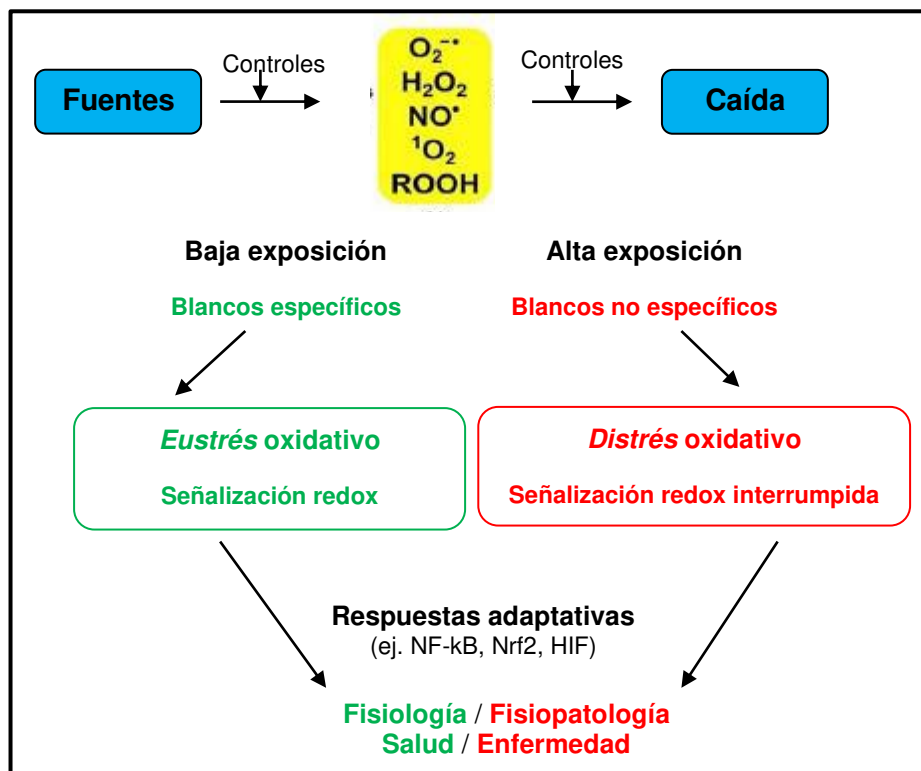


Figura 9. Señalización redox y su relación con el estrés oxidativo³⁹.

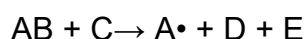
Se lleva a cabo un gran desequilibrio molecular por sustancias químicas conocidas como radicales libres (RL), en el cual sus electrones realizan su recorrido orbital de forma impar; un compuesto se transforma en RL cuando gana un electrón (reducción), cuando pierde un electrón (oxidación molecular) o en la división simétrica de los compuestos covalentes, donde cada fracción retiene al electrón impar, como sucede típicamente en la lipoperoxidación⁴⁰.

Los RL buscan obtener una distribución electrónica estable, por lo tanto, por medio de las reacciones redox (reacciones de óxido reducción) interactúan con otras moléculas, generándose una reacción en cadena y logrando la estabilidad cuando dos radicales libres reaccionen entre sí o se sustrae el electrón de sus proximidades llegando así a la paridad electrónica^{40,41}.

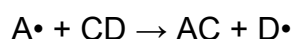
Los radicales libres son moléculas altamente inestables y reactivas ya que son de carácter paramagnético, presentan una vida media corta y tienen capacidad para combinarse inespecíficamente con diferentes moléculas y capacidad para atacar a cualquier tipo de biomoléculas⁴¹.

Las reacciones bioquímicas dadas se clasifican en 3 grupos⁴⁴:

-Reacciones de iniciación: A partir de no radicales se forma un radical libre.



-Reacciones de propagación: Reacción de molécula estable con radical libre generando la formación de radical libre.



-Reacciones de terminación: Reacción entre dos radicales libres, generando un producto estable⁴⁴.



Las especies reactivas contiene dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales, originado en procesos fisiológicos normales como en procesos patológicos. Los RL se pueden clasificar por el grupo funcional que presente en su molécula, tales como, nitrógeno, oxígeno, bromo, tiol, fósforo, etc. Las RNS y ROS son dos grupos grandes que están implicados en la biología redox (reacciones de oxido reducción), aunque los radicales libres de oxígeno son de gran importancia y los más comunes ya que forman parte de los diversos procesos aeróbicos⁴¹.

Las EROS, que son sustancias prooxidantes, pueden llegar a convertirse en peligrosos productos del metabolismo celular generados a través del proceso de reducción parcial del oxígeno, ya que se genera el estrés oxidativo producto del desequilibrio entre sustancias prooxidantes y sustancias antioxidantes, llevándose a cabo variados procesos patológicos⁴¹.

Entre las más destacadas ERO están: H_2O_2 , el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\bullet), y el ácido hipocloroso (HOCL)⁴⁰. Algunas de sus características principales de estas EROS se mencionan en la Tabla 2.

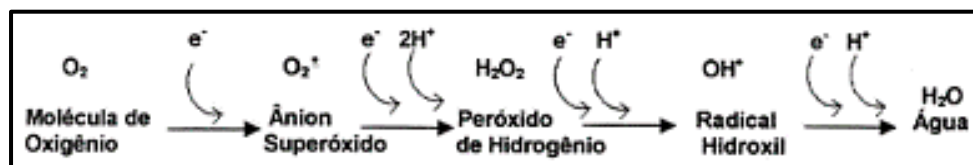


Figura 10. Esquema de producción de las EROS⁴¹.

Tabla 2. Algunas características principales de las especies reactivas del oxígeno (EROS)⁴¹.

Especies reactivas de oxígeno	Símbolo	Propiedades
Superóxido	O_2^\bullet	Buen reductor, pobre oxidante. Es importante porque genera más ERO como OH^\bullet y H_2O_2 .
Hidroxilo	OH^\bullet	El más poderoso oxidante en sistemas biológicos. Extremadamente reactivo (reacciones de adición, abstracción y transferencia de electrones). Muy baja distancia de difusión.
Peroxil	ROO^\bullet	Baja capacidad oxidante pero gran difusibilidad.
Alcoxil	RO^\bullet	Intermedio en su reactividad con lípidos
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Originado a partir de la dismutación de O_2 por la enzima SOD. Alta capacidad de difusión. Puede originar RL muy reactivos cuando reacciona con los metales de transición
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	Potente agente oxidante con un tiempo medio de 10^{-6} s.

Las fuentes de radicales libres son formados por tipo endógeno (fallas en el proceso a nivel de la mitocondria, peroxisomas, citocromo P-450, fagocitosis, entre otras); y por tipo exógeno (tabla 3)^{40,41}.

Ya que sabemos que los RL están relacionados a las funciones indispensables biológicas e innumerables patologías corporales; se ha dedicado un considerable

esfuerzo en investigarlo con relación a la patogenia de las enfermedades. Por ejemplo, las patologías del desarrollo pueden resultar de la formación endógena o exógena (xenobiótico) de ERO, donde las macromoléculas como las proteínas, el ADN y lípidos celulares se dañan oxidativamente y el alterar la transducción de señales traen disfunción celular, muerte intrauterina y teratogenicidad⁴⁰.

Tabla 3. Principales fuentes externas que incrementan la producción de ERO⁴¹.

FUENTES EXTERNAS	EJEMPLOS
Contaminantes	Fibras de asbestos Polvos de minerales Ozono Monóxido de carbono Óxido nítrico y Dióxido de nitrógeno Sílice Solventes Toxinas Hipocloritos Dióxido de sulfuro Bifenilos policlorados Paraquat y Diquat
Drogas	Acetaminofeno Ciprofloxacino Antidepresivos tricíclicos Nitrofurantoínas Antidiabéticos Bleomicina Doxorrubicina
Iones metálicos	Hierro Cobre Cadmio Níquel Cromo Mercurio
Radiaciones	Ultravioleta Rayos X Gamma
Dieta	Ácidos grasos poliinsaturados Glucosa
Otros	Tabaco Ejercicio intenso

Las ERO pueden llegar a originar diversos daños por su gran reactividad, tales como oxidación de grupos sulfidril de proteínas, lipoperoxidación (oxidación de lípidos), oxidación de bases púricas y pirimidínicas; que generan alteración y daños a nivel celular siendo sólo el inicio para que se desencadene diversas patologías.

Enfermedades como artritis reumatoidea, Parkinson, VIH, entre otras están relacionadas con las ERO según diversos estudios⁴¹.

4.3.3. Sistemas antioxidantes

Se puede conceptualizar a un antioxidante como la sustancia que evita o retrasa significativamente la oxidación del sustrato cuando se encuentra en baja concentración en relación con la de un sustrato oxidable⁴⁵. Los antioxidantes son conocidos como agentes reductores ya que previenen reacciones de oxidación, generalmente eliminando las ERO antes de que dañen a las células, esto se lleva a cabo previniendo el consumo de oxígeno por parte de otros compuestos. Aquel compuesto que se oxida sencillamente a sí misma es posible que sea un compuesto con propiedad antioxidante⁴⁰.

Los antioxidantes tienen la capacidad de evitar o retardar que los sustratos que son fácilmente oxidables como las proteínas, DNA, lípido, etc. se oxiden⁴¹. A los sistemas antioxidantes se le clasifican como exógenos y endógenos que restringen la generación y actividad de ERO, manteniendo así el sistema controlado; también se clasifican de acuerdo con su solubilidad en el agua, teniendo así a los antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos respectivamente, pudiendo presentarse en diferentes rangos de concentraciones en los tejidos y fluidos corporales, u distribuido uniformemente en el organismo⁴⁰.

Se desarrollaron sistemas de defensa antioxidante para poder neutralizarse a las especies reactivas que se generen de cualquier elemento, se encuentra conformado por elementos enzimáticos (primera línea de defensa primaria) y elementos no enzimáticos⁴¹. Los elementos enzimáticos como sistemas antioxidantes endógenos catalizan la transferencia de electrones de sustrato hacia los RL, evitando así el acúmulo de EROS. Dentro de ellos tenemos: CAT (catalasa) encargada de la transformación del H_2O_2 en H_2O y O_2 , SOD (superóxido dismutasa); convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, la GPx (glutación peroxidasa); que en un primer lugar oxida glutatión y posteriormente reduce el peróxido de hidrógeno^{40,41}, GST y Prx⁴⁶.

Los antioxidantes no enzimáticos producen moléculas menos dañinas para la célula ya que capturan y estabilizan al RL. Dentro de ellos tenemos: Vitamina C, glutatión, flavonoides polifenólicos (un amplio grupo de compuestos fenólicos como catequinas, cianidinas, quercetinas, etc.; y vitamina E, vitamina A, ubiquinona (coenzima Q), la albúmina, el ácido lipoico, entre otros)⁴¹.

Entre los antioxidantes exógenos tenemos a los polifenoles, algunos metales (selenio, zinc y cobre), la melatonina y las vitaminas A, C y E. La determinación de los antioxidantes como las vitaminas A, C, y E, revolucionó a la bioquímica y llevó a establecerse el gran valor que tienen los antioxidantes en los seres vivos⁴⁰.

El efecto que pueden llegar a presentar los antioxidantes generalmente está influenciado por diversos factores, entre ellos tenemos: concentración, características estructurales, temperatura, tipo de sustrato de oxidación, así como la presencia de oxidantes y sinergistas⁶. Así mismo dependerá de la condición que tienen los antioxidantes con los que se lleve a cabo la interacción y de la reactividad frente a la ERO⁴⁰.

4.3.4. Compuestos bioactivos antioxidantes en plantas medicinales

Los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos que exhiben bioactividades como la antioxidante, éstas son sustancias que lograrían retardar, inhibir o evitar que se lleven a cabo procesos que generen RL y oxidaciones catalíticas³.

Diversos estudios afirman que las actividades biológicas de los AE y sus componentes aromáticos presentan diversos efectos farmacológicos, incluidos la actividad antioxidante, entre otros²³.

Entre las propiedades antioxidantes de variedad de plantas aromáticas se resalta la facultad de regularizar alteraciones que guardan relación con el estrés oxidativo inducido por los radicales libres (RL) y las ERO, por lo que ganan todavía más el interés de diversos grupos de investigación que ven el uso de aditivos naturales como antioxidantes potenciales³.

Actualmente la tendencia de los consumidores se inclina hacia los alimentos libres de aditivos químicos sintéticos (colorantes, neutralizantes, antioxidantes, preservantes y saborizantes) y de productos de síntesis química (pesticidas, fungicidas, insecticidas, fertilizantes, entre otros), por lo que resulta interesante investigar la propiedad antioxidante de los AE de plantas nativas para establecer su utilización potencial como aditivos naturales en los alimentos⁴⁷, con objetivo de conservar una adecuada nutrición y contribuir en la preservación de defensas antioxidantes.

Los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica son el BHT y BHA; no obstante, se han hallado efectos secundarios en seres vivos, y el uso de estos antioxidantes sintéticos incluido también el nitrito sódico, pueden conducir a envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, hepatomegalia, aumento del colesterol, puede inducir a un cáncer hepático, entre otros tipos de cáncer^{45,48}.

Se han extraído gran cantidad de antioxidantes de diferentes especies de plantas, donde los antioxidantes de tipo fenólicos (fenoles simples, ácidos fenólicos, derivados de ácido hidroxycinnámico y flavonoides) ocupan una mayor importancia. Se ha demostrado en diversos ensayos que los compuestos fenólicos como el ácido rosmarínico, ácido carnósico, y los flavonoides, son los más potentes antioxidantes comparados con el BHA, BHT y otros antioxidantes de origen sintéticos⁴⁸.

La propiedad antioxidante de los AE está relacionado con la presencia de componentes capaces de extinguir los radicales, esto se menciona en la sección del modo de acción antioxidante de los aceites esenciales del libro del investigador Mohammad S. donde se recopila información de estudios que revisan las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales y sus componentes mencionando que los componentes extraídos de las plantas aromáticas tenían cantidades importantes de componentes antioxidantes. Entre los más relevantes que contienen un alto porcentaje e imparten actividad antioxidante a un AE son aquellos que presentan un grupo fenólico (como timol, carvacrol y eugenol) y algunos compuestos no fenólicos que presentan la estructura de ciclohexadienilo (d y e) de la figura 11⁴⁹.

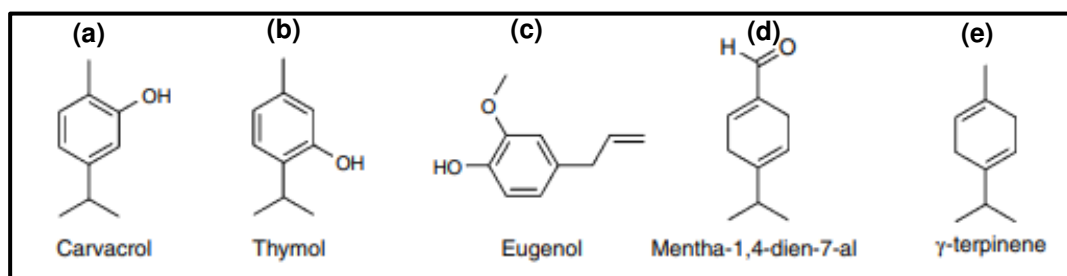


Figura 11. Constituyentes fenólicos y no fenólicos de aceites esenciales que presentan propiedades antioxidantes⁴⁹.

4.4. Actividad antimicrobiana

Al expresar el concepto de actividad antimicrobiana, no solo nos referimos a la capacidad que tiene una sustancia o componente de inhibir la proliferación de bacterias, sino de ejercer su efecto inhibitorio frente a cualquier microorganismo como hongos, bacterias, parásitos que pueden provocar diversas infecciones graves llevando incluso a la muerte de los seres humanos^{50,51}.

Los aceites esenciales han sido usados durante muchos años en diversos ámbitos (alimentos o perfumería), pero además fue muy usado en la medicina popular, debido a sus diferentes propiedades biológicas como acción larvicida, analgésico, agente antiséptico, propiedades antiinflamatorias, antioxidante, entre otras, incluidas las propiedades antimicrobianas⁵².

La propiedad antimicrobiana de los AE se ha probado exhaustivamente in vitro contra una amplia gama de bacterias y hongos patógenos, así mismo en los últimos años ha presentado un creciente interés porque se ha demostrado ser efectivo incluso contra cepas resistentes a múltiples fármacos tales como *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros^{53,54}.

Según el informe de la OMS en cuanto a la resistencia a los medicamentos, entre los problemas más graves incluyen la resistencia de *Escherichia coli* a cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolona, *Staphylococcus aureus* a meticilina, entre otros⁵². Así mismo la OMS menciona que el agente responsable de brotes de enfermedades que se transmiten por los alimentos es *Escherichia coli*, causando así un problema creciente y generalizado de salud pública más extendido

a nivel mundial, que afecta principalmente a la población infantil y es causa de millones de muertes⁵⁵.

Las infecciones causadas por hongos han adquirido más importancia en las últimas décadas, ya que presentan una alta mortalidad, éstas son generalmente causadas en un 20 % a 50 % de los casos por las especies del género *Candida*, siendo *Candida albicans* la especie más importante⁵⁶.

En el Perú, se puede afirmar que la incidencia anual de las infecciones fúngicas ha aumentado de 3 a 20 veces a partir de la década del 70, específicamente fungemia por *Candida no albicans* aislado en un 60.1% en un estudio en nueve hospitales de Lima (2009-2011) y reportándose específicamente el aumento del aislamiento de *C. tropicalis*⁵⁶⁻⁵⁷. La utilización en gran proporción de los antifúngicos tanto de manera terapéutica como preventiva ha llevado que se presenten resistencias secundarias y posiblemente que aparezcan cepas más resistentes frente al desplazamiento de las cepas sensibles. Todo ello amplía más la visión de descubrir nuevas moléculas que presenten actividad antifúngica o fungistática para tratar este tipo de afecciones⁵⁶.

4.4.1. Infecciones ocasionadas por *Candida albicans*

El género *Candida* tiene una morfología de levadura oval característica de 2–7 µm de diámetro, se reproduce por blastoconidias. Se encuentran presentes en personas sanas (individuo inmunocompetente) conviviendo como microorganismos comensales, ya que forman parte de la flora normal de piel y mucosa en la mayoría de sistemas del cuerpo humano (gastrointestinal, respiratorio y genitourinario). Sin embargo, la *Candida* puede convertirse en patógeno oportunista, cuando el sistema inmunitario del huésped está comprometido, causando diferentes tipos de candidiasis^{58,59}.

Las especies de *Candida* guardan relación con las infecciones dadas a pacientes hospitalizados en UCI, ya que son uno de los microorganismos que se encuentran más implicados en infecciones de pacientes críticos generándose un incremento en la morbilidad. Existen 163 especies pertenecientes al género *Cándida*, siendo las especies más frecuentes: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. Lusitania*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C.*

guilliermondii y *C. famata*. Pero en términos generales se suelen agrupar en cuanto a su distribución clínica en los términos: *Candida albicans* y *Candida no albicans*. Una de las principales diferencias es que la primera es dimórfica⁵⁸.

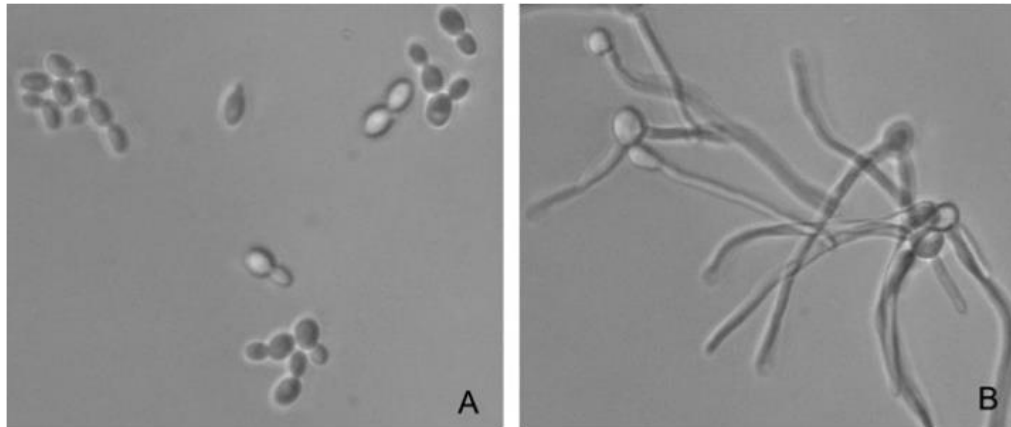


Figura 12. Morfología celular de *Candida* sp. Donde: (A) forma de levadura y (B) forma de hifas⁵⁹.

La especie *C. albicans* puede desarrollarse como levaduras o hifas, es una especie dimórfica, pero es una de las pocas especies que forman verdaderas hifas y clamidoconidios. Es la especie más patógena del género *Candida*, ya que es causante del 37% a 70% de infecciones por hongos de este género⁵⁹.

La candidiasis es una micosis en el que cualquier tejido puede afectarse, presentándose variedad de cuadros clínicos, sin embargo, *C. albicans* serotipo B es el causante del más de 70% de los casos. Podemos catalogar en candidiasis del tipo superficial donde se ven afectadas la piel y mucosas, y la candidiasis sistémicas o invasivas; las del tipo superficial son comunes y de sencillo tratamiento, mientras que las sistémicas (crónica o aguda) son normalmente graves⁶⁰.

Entre las manifestaciones clínicas de las candidiasis invasivas tenemos con mayor frecuencia a la candidemia que corresponde a un 30%, donde las puertas de entrada más común son la piel y el tracto gastrointestinal. Entre otras afecciones grave con mayor frecuencia tenemos: peritonitis, meningitis, endoftalmitis, esofagitis, y endocarditis infecciosa⁵⁸.

4.4.2. Modos de acción de los aceites esenciales

El uso de AE como agente antimicrobiano presenta la ventaja adicional de disminuir la posibilidad de aparición de resistencia antimicrobiana, ya que estos presentan diferentes compuestos químicos que pueden tener diferentes modos de acción, uno de ellos es el efecto disruptivo que ejercen sobre la membrana citoplasmática debido a aumento de la permeabilidad de ATP al medio extracelular⁶¹.

Se postulan diversas teorías sobre el mecanismo implicado en la acción antimicrobiana de los aceites esenciales, no obstante, aún no se ha establecido claramente, mencionándose en estudios realizados que se debe a la disposición que tienen los AE de atravesar las membranas microbianas interaccionando con los organelos que están en el citoplasma celular, de esa manera logran interferir en el metabolismo celular y propiedades funcionales de la célula ocasionando la muerte celular del patógeno. El ingreso de aceites esenciales genera una sobrecarga de la membrana celular, originando la pérdida del control y de su integridad^{62,55}.

Se sugiere entonces que las bacterias gramnegativas son más tolerantes a los tratamientos con AE debido al hecho de que poseen una membrana externa impermeable, que bloquea el paso de AE hidrófobos dentro de la membrana celular. Esta membrana externa tiene una característica hidrofílica y funciona como una barrera de permeabilidad fuerte y eficiente a las moléculas lipofílicas porque contiene lípido inusual, lipopolisacáridos (LPS) y porinas que permiten la difusión de moléculas hidrofílicas a través de él y hacia dentro de la célula de la bacteria⁶¹.

La hidrofobicidad de los aceites esenciales es responsable de la alteración de las estructuras bacterianas. Los mecanismos de acción de los aceites esenciales en las bacterias son: desintegración de la membrana citoplasmática y pared celular, coagulación citoplasmática y difusión a través de la doble capa lipídica de la membrana, junto con la alteración de su permeabilidad y función⁵⁴.

4.4.3. Metabolitos antimicrobianos de los aceites esenciales

Resulta importante mencionar que moléculas estarían implicadas en proporcionar la acción antimicrobiana a los AE, sus propiedades biológicas y químicas dependen de los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales aislados, y adicionalmente puede existir una variación en el porcentaje de compuestos químicos, esto depende del proceso de extracción, procesamiento de muestras y condiciones ambientales⁶³.

Estudios actuales sugieren que aquellos aceites esenciales que contienen altas cantidades de terpenos y terpenoides (como orégano, tomillo o aceite de limón), que contienen grupos aldehídos, grupos cetónicos y/o grupos alcoholes; así mismo un gran porcentaje de compuestos monoterpénicos son activos contra muchas especies bacterianas, incluidos los altamente resistentes y adaptables como MRSA o *Pseudomonas spp*^{54,62}. Adicionalmente en un estudio realizado al aceite esencial de *S. graveolens* se puede atribuir la actividad antibacteriana a la presencia del monoterpeno sabineno⁶².

El componente carvona, encontrada en aceites cítricos, ha sido reportada como activa en la inhibición de un gran grupo de bacterias grampositivas y gramnegativas. Así mismo en otros estudios realizados sugieren que los monoterpenos oxigenados, como 4-terpineol, α -terpineol, cis-geraniol, β -citral, nerol y α -citral podría ser responsable de la eficacia antibacteriana de dos variedades de aceites de limón (*Citrus limon*). Así mismo se ha demostrado que el compuesto limoneno se ha estudiado por su actividad antibacteriana contra bacterias patógenas grampositivas y gramnegativas, donde el isómero (-) - limoneno era el más activo contra siete bacterias. Dependiendo de la bacteria, la actividad de (-) - limoneno variaba, siendo *B. cereus* y *P. aeruginosa* las bacterias más sensibles a este componente y *E. faecalis* el más resistente a la acción de este compuesto⁶¹.

Por otra parte, la naturaleza fenólica de algunos compuestos tiene una gran relación con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales; ya que dichos

compuestos fenólicos interrumpen la membrana celular haciendo la membrana más permeable. Dentro de estos compuestos tenemos principalmente al timol y carvacrol⁶⁴.

Tenemos por ejemplo en el caso del aceite esencial del orégano, un componente principal del aceite esencial es el carvacrol, conforma el 80.5% de la composición, el carvacrol es un fenol monoterpenoide, éste compuesto presenta una buena actividad antibacteriana por permeabilización y despolarización de la membrana citoplasmática, también inhibe la producción de toxinas de los microbios, inhibe la formación de biopelículas, entre otros⁵⁴. Se encontró también que el AE de canela presenta un componente que incrementa la liberación de enzimas digestivas e impide la proliferación de bacterias, dicho componente es el eugenol que le da una alta actividad antimicrobiana⁶⁵.

La eficacia antifúngica de los aceites esenciales puede estar relacionada con la presencia de algunos componentes activos como carvacrol, acetato de α -terpinol, cimeno, timol, pineno y linalool, que también se conocen como componentes activos en la acción antimicrobiana de los AE. El grupo CHO de aldehídos insaturados, obtenido de la conjugación de un carbono en forma de $C = C$, es otro componente característico de los AE que presenta acción antifúngica⁴⁹.

Otro estudio atribuye la actividad antifúngica de *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Aspergillus flavus* a la existencia de componentes como cinamaldehído y eugenol en los aceites esenciales, que intervienen directamente sobre la membrana fúngica inhibiendo el desarrollo de microorganismos fúngicos⁶⁵.

La actividad antimicrobiana y antifúngica de los AE no se debe solo a la acción de un compuesto y ciertamente la composición química es el factor más importante para dicha actividad. Efectos biológicos del aceite esencial está caracterizado por el mayor componente que se presenta a altas concentraciones. En la figura 13 se menciona algunos de los componentes de fuentes de aceites esenciales que muestran actividad antimicrobiana y antifúngica frente a cepas específicas⁴⁹.

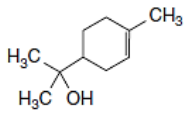
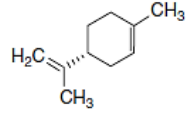
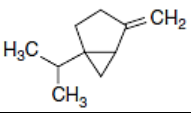
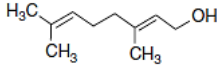
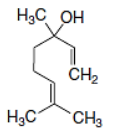
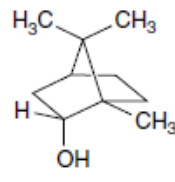
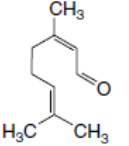
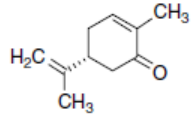
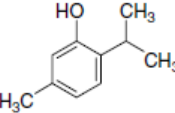
Componente	Fuentes de aceites esenciales	CMI (µg/mL)	Fórmula estructural
α-terpinol	<i>Cryptomeria japonica</i> , té verde	<i>E. coli</i> : 1600 <i>S. aureus</i> : 1600 <i>Streptococcus spp.</i> : 50–3200	
D-Limoneno	Derivados de cítricos, aceites esenciales como naranja, limón, mandarina, lima, pomelo.	<i>S. aureus</i> : 1 <i>B. subtilis</i> : 1 <i>E. coli</i> : 1 <i>S. cerevisiae</i> : 0.5	
Sabineno	<i>Cryptomeria japonica</i> , zanahoria (jugo)	<i>E. coli</i> : 1600 <i>S. aureus</i> : 1600 <i>Streptococcus spp.</i> : 100–1600	
Geraniol	Palmarosa (<i>Cymbopogon martini</i>),	<i>E. coli</i> : 0.5 <i>S. typhimurium</i> : 0.5 <i>L. monocytogenes</i> : 1	
Linalool	Basil, cilantro, té verde	<i>Streptococcus spp.</i> : 100–3200	
d- Borneol	<i>Cinnamomum camphora</i>	<i>P. aeruginosa</i> : 125 <i>E. coli</i> : 250 <i>B. subtilis</i> : 125 <i>S. aureus</i> : 125 <i>H. anomala</i> : 250 <i>S. cerevisiae</i> : 125 <i>A. niger</i> : 250 <i>C. globosum</i> : 62.5	
Citral	Limoncillo, cáscara de cítricos	<i>E. coli</i> : 0.5 <i>S. typhimurium</i> : 0.5 <i>S. aureus</i> : 0.5 <i>L. monocytogenes</i> : 0.5	
Carvona	<i>Ocimum sanctum</i>	<i>Candida spp.</i> : 250–350	
Timol	Orégano, tomillo	<i>E. coli</i> : 0.225–0.45 <i>S. typhimurium</i> : 0.056 <i>S. aureus</i> : 0.140–0.225 <i>L. monocytogenes</i> : 0.450 <i>B. cereus</i> : 0.450	

Figura 13. Estructuras químicas de algunos componentes seleccionados de aceites esenciales con actividad antimicrobiana⁴⁹.

4.4.4. Ensayos para determinar la actividad antioxidante

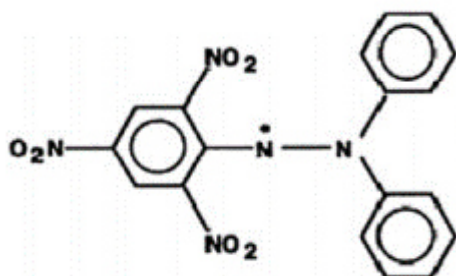
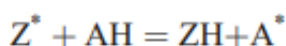
Dentro de los ensayos más conocidos para realizar la determinación de la actividad antioxidante se encuentran los ensayos mediante la captación del radical DPPH y ABTS.

4.4.4.1. Ensayo de DPPH

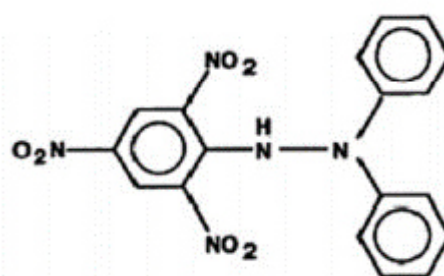
El DPPH o 2,2- difenil-1-picrilhidazil es un radical estable cromóforo de color morado oscuro. La reacción con otros radicales, electrones o átomos de hidrógeno conducen a la pérdida de color del DPPH medido por espectro UV-VIS a 517 nm con la pérdida de la señal de radicales libres, y sirve como un indicador de la capacidad antioxidante, esta reacción se basa en la donación electrónica de antioxidantes para neutralizar el radical DPPH. Por lo tanto, este método se basa principalmente en la suposición de que la actividad antioxidante es igual a su capacidad de donación del electrón o el llamado poder reductor^{6,66}.

La reacción primaria se muestra en la Figura 14, representando al radical DPPH por Z• y la molécula donante por AH, donde ZH es la forma reducida y A• es radical libre producido en el primer paso. La molécula DPPH (Z•) está destinada a representar los radicales libres formados en el sistema cuya actividad debe ser suprimida por la sustancia AH⁶⁷.

La reacción primaria es:



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)
Color morado



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)
Amarillo pálido

Figura 14. Radical DPPH (como radical libre) y su forma estable⁶⁷.

4.4.4.2. Ensayo de ABTS •+

El ensayo de la captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ mide la capacidad de los antioxidantes o muestras con dicha capacidad antioxidante para eliminar el catión estable $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis (3- ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), que presenta inicialmente un azul verdoso cromóforo con absorción máxima a 734 nm y que disminuye en su intensidad en presencia de antioxidantes⁶.

$ABTS^{\bullet+}$ puede ser generado directamente utilizando persulfato de potasio como el agente oxidante, los antioxidantes luego reaccionan solo con $ABTS^{\bullet+}$ (Figura 15)⁶⁶. Entonces se explica que el ABTS inicialmente se somete a una reacción de oxidación con permanganato de potasio, persulfato de potasio o 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano), produciendo el catión radical del ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) con un color azul verdoso. El $ABTS^{\bullet+}$ es estable por varios minutos, el $ABTS^{\bullet+}$ se somete a la muestra antioxidante, causando la reducción de $ABTS^{\bullet+}$ y, en consecuencia, la decoloración de la reacción mezcla (Figura 16). Por lo tanto, el grado de decoloración se puede expresar como el porcentaje de inhibición de $ABTS^{\bullet+}$, que se determina en función del antioxidante concentración y tiempo⁶⁸.

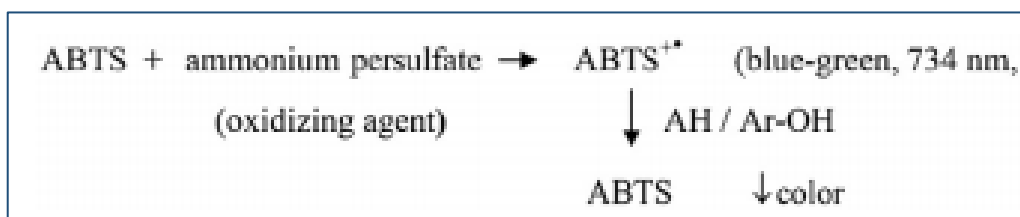


Figura 15. Reacción de ABTS (forma estable) y agente oxidante generando $ABTS^{\bullet+}$ (como radical libre)⁶⁶.

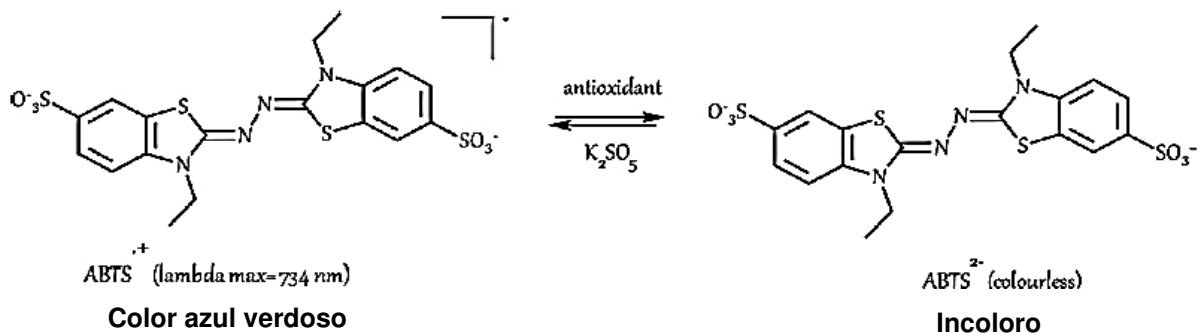


Figura 16. Radical $ABTS^{\bullet+}$ (como radical libre) y su forma estable⁶⁸.

4.4.5. Ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana

En vista de que varios autores han subrayado la necesidad de un método estándar y reproducible, se han desarrollado muchos métodos específicamente para determinar la acción antimicrobiana de los AE. Los beneficios de fundamentar nuevos métodos en ensayos convencionales preexistentes, como los métodos NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), ya que estos ensayos tienden a ser más sencillamente aceptados por los organismos reguladores. Aunque los métodos NCCLS se han desarrollado para evaluar los agentes antimicrobianos convencionales, como los antibióticos, con modificaciones menores, estos métodos pueden ser adecuados para la prueba de aceites esenciales⁵³.

En la actualidad se cuenta con dos métodos de referencia para determinar la resistencia antifúngica, tenemos el CLSI de EUA (Estados Unidos americanos) y EUCAST de Europa, mediante método de susceptibilidad in vitro para levaduras, en ambas técnicas se emplea la microdilución en caldo, variando en el tamaño de inóculo y puntos de interpretación⁵⁶.

5. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de investigación:

-Experimental: Debido a que se valoró y/o comparó el efecto de una o más variables.

-Comparativo: Porque se contrastó los resultados del experimento.

- In vitro: Porque la técnica para realizar el experimento se realizó en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

5.2. Lugar de realización de la investigación

El presente análisis de la propiedad antioxidante se llevó a cabo en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”; el estudio de la acción antimicrobiana y efecto fungistático se realizaron

en el Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. La Cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/EM) se efectuó en las instalaciones de LABICER de la Universidad Nacional de Ingeniería.

5.3. Material vegetal

Se recolectaron las hojas de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “Junjulí” en la localidad de Jaípe, Distrito de Camporredondo, Provincia de Luya perteneciente al Departamento de Amazonas, a finales de julio del 2018 (Figura 17). De las hojas recolectadas, se seleccionaron sólo las hojas frescas y se separaron aquellas hojas que se encontraban deterioradas o con hongos (Figura 18). La clasificación taxonómica y Certificación botánica se realizó a cargo del Biólogo Colegiado José Campos De La Cruz de la UNMSM, ésta se reporta en el anexo N°1.



Figura 17. Extracción de las hojas de *Persea caerulea* por el recolector del pueblo. Fuente: propia del autor.



Figura 18. Selección de las hojas a trabajar de *Persea caerulea* para la obtención del aceite esencial.

En la figura 19 se muestra un Flujograma general del trabajo experimental donde se muestra en orden todos los pasos y ensayos que se realizaron a la muestra de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez (junjulí).

FLUJOGRAMA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

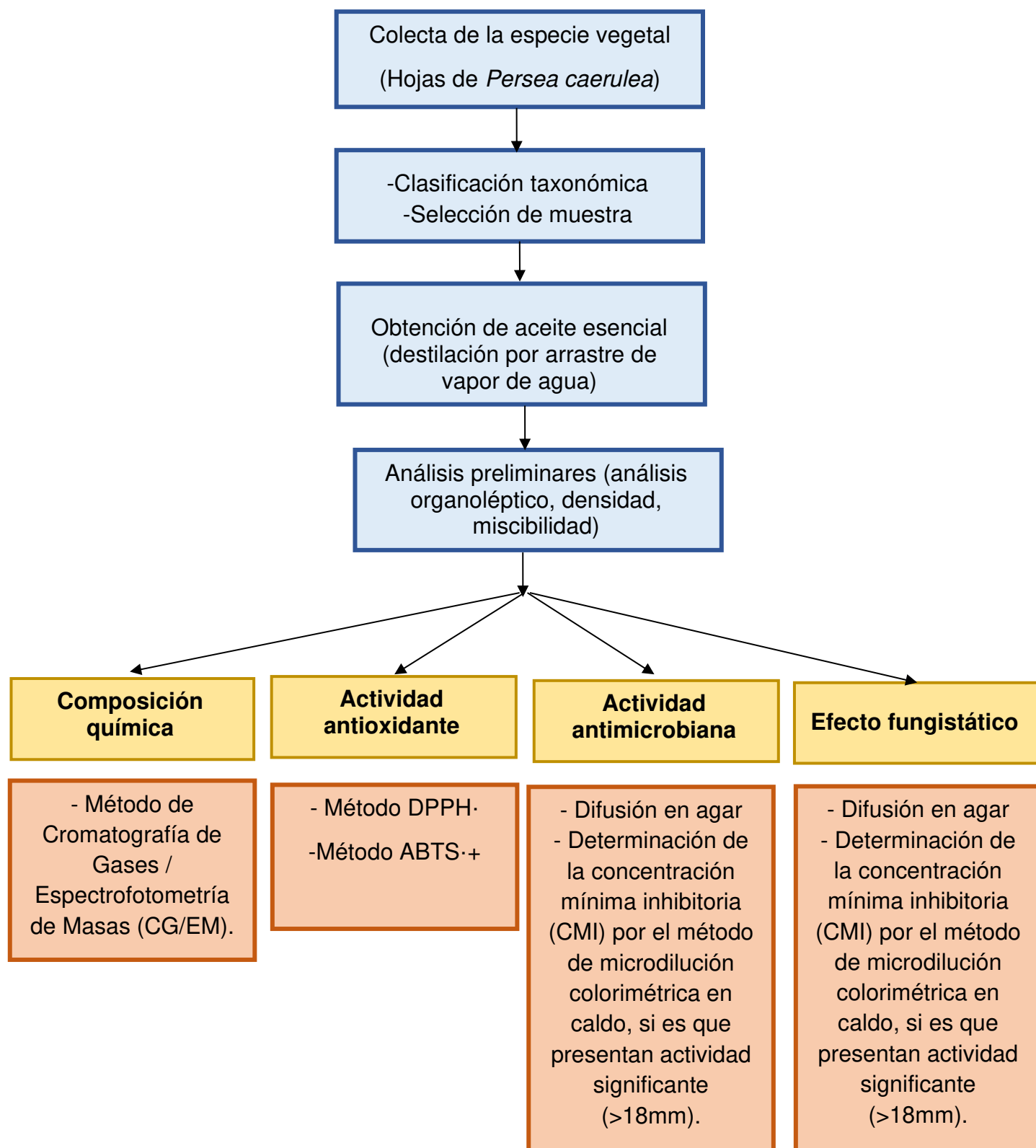


Figura 19. Flujograma de los ensayos que se realizaron a la muestra de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez (junjulí).

Fuente: Elaboración propia

5.4. Obtención del aceite esencial

Un promedio de 30 kg de hojas desecadas y seleccionadas de *Persea caerulea* “Junjul” fueron tratadas dentro del sistema de destilación de arrastre con vapor de agua para la obtención del aceite esencial (Figura 20). El destilado se separó utilizando una pera de separación, teniendo en cuentas sus características de inmiscibilidad y diferencias de densidades (aceite vs. H₂O).

Posterior a la obtención del aceite esencial, se deshidrató las impurezas de agua con cristales de sulfato de sodio anhidro y posteriormente se almacenó en un frasco ámbar protegido de la luz y bajo refrigeración (4°C) hasta su uso.



Figura 20. Destilación por arrastre con vapor de agua para la obtención del aceite esencial. Fuente: propia del autor.



Figura 21. Obtención del aceite esencial. Donde: A: Dos fases obtenidas (acuosa y oleosa), B: Separación de la fase oleosa (aceite esencial).

Fuente: propia del autor.

5.5. Determinación del rendimiento

El porcentaje de rendimiento del AE se determinó por el método gravimétrico-volumétrico⁶⁹, a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ RAE} = \frac{\text{Vol. AE (mL)}}{\text{P muestra (g)}} \times 100\%$$

Donde: RAE: rendimiento de aceite esencial, Vol.AE: volumen del aceite esencial obtenido y Pmuestra: peso de la muestra a destilar; obteniéndose un rendimiento de valor de 0,095% p/v.

5.6. Análisis preliminares

Así mismo se realizó ensayos adicionales al aceite esencial obtenido; como son: el análisis organoléptico, determinación de densidad y ensayo de miscibilidad.

La densidad fue hallada mediante el método de la USP N° 42 < 841>- Método I⁷⁰, los resultados se muestran en la tabla 10.

El ensayo de miscibilidad del aceite se realizó para determinar el solvente adecuado donde el aceite de junjolí es miscible para poder realizarse las posteriores pruebas de actividad antioxidante, antimicrobiana y efecto fungistático.

5.7. Identificación y cuantificación de la composición química mediante CG / EM

Los componentes químicos del AE extraído previamente se determinó por CG/EM usando un SHIMADZU, GC-2010 Plus como CG y SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra como detector de espectrometría de masas; equipado con una columna GC RESTEK de tipo RTX-5MS, 30m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m df.

La detección y elucidación de los componentes químicos se realizó por comparación con los estándares de espectros de masas de las respectivas bibliotecas. El componente principal del aceite esencial se determinó mediante dos metodologías: Análisis por Inyección Headspace-HS y por Análisis por Inyección Líquida- LS.

Tratamiento de la muestra: 01 muestra del aceite esencial (AE) extraído se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró usando un filtro de jeringa de 0.45 μ m.

Para el análisis por inyección Headspace- HS (donde se determinan los componentes más volátiles): Se tomaron 200 μ L de la muestra filtrada y se colocó en el vial de HS de 10mL. Dicho vial se colocó inmediatamente en el auto muestreador del GCMS para la lectura. Las condiciones operativas fueron las siguientes:

Tabla 4. Condiciones de operación del inyector Headspace.

Inyector Headspace (AOC-6000)	
Jeringa	2.5 mL-HS1
Temperatura de incubación	60°C
Tiempo de incubación	20 min
Temperatura jeringa	60°C
Velocidad de agitación	250 rpm
Tiempo de Pre purga	5 seg
Puerto de Inyección	SPL1
Flujo de Inyección	10mL/min
Tiempo de post purga	10 seg
Puerto de inyección	
Tipo	Split
Razón de Split	49.0
Temperatura	220°C
Tipo	Helio
Modo de control de flujo	Velocidad lineal (32.4 cm/seg)
Flujo de columna	0.80 mL/min
Flujo de purga	3 mL/min

La programación de la temperatura de columna para CG empezó en 50°C durante 30 min, luego se incrementó a 3°C/ min hasta 150°C durante 10 min, seguida de 3°C/ min hasta 250°C por 20 min. El tiempo total programado fue de 126,67 min.

Las condiciones de espectrometría de masas presentaron una energía de ionización de 70Ev, con una temperatura de fuente de iones de 250°C y temperatura de interfaz de 290°C. El tiempo de inicio fue de 3 min.

Para el análisis por inyección Líquida- LS (Liquid syringe): Se diluyó la muestra filtrada en la proporción de 1:100 (v: v) en acetona filtrada y se colocó en un vial de 10mL. Dicho vial se colocó inmediatamente en el auto muestreador del GCMS para la lectura. Se tuvieron las siguientes condiciones operativas:

Tabla 5. Condiciones de operación de inyección líquida.

Inyección Líquida (AOC-6000)	
Jeringa	LS1- 10 μ L
Ciclo de Pre-Enjuague	3
Ciclos de Enjuague con muestra	1
Razón de flujo de aspiración	1 μ L/s
Inyector	SPL1
Razón de Flujo de Inyección	100 μ L/min
Ciclos Post-Enjuague	3
Volumen de Inyección	1 μ L
Puerto de inyección	
Tipo	Split
Razón de Split	20.0
Temperatura	220°C
Tipo	Helio
Modo de control de flujo	Velocidad lineal (32.4 cm/seg)
Flujo de columna	0.80 mL/min
Flujo de purga	3 mL/min

La programación de la temperatura de columna para CG fue la misma que la realizada por análisis por inyección Headspace.

Las condiciones de espectrometría de masas fue la misma que la realizada por análisis por inyección Headspace donde la energía de ionización fue de 70eV.

En ambos casos los componentes se identificaron mediante un estudio de comparación de los EM con el resultado probabilístico obtenido por el software del equipo GCMSsolution de SHIMADZU utilizando la librería NIST. La coincidencia de alta probabilidad de cada pico del cromatograma de los componentes correspondientes se mide por el SI (Similarity index) que se encuentra en cada espectro de masa (en el texto superior a las gráficas del Anexo N°3).

5.8. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante del AE obtenido previamente fue desarrollada in vitro mediante los siguientes ensayos: mediante la captación del radical DPPH que se determinó mediante el método de Brand Williams et. al.⁷¹ y la captación del radical ABTS se determinó mediante el método de Re et al.⁷². La muestra fue diluida con etanol absoluto y el estándar de referencia usado fue Trolox®; las absorbancias fueron leídas en un espectrofotómetro UV-VIS a temperatura ambiente, las mediciones fueron realizado por triplicado y fueron calculados el promedio con desviaciones estándar.

- **Reactivos e insumos químicos:**

Los reactivos y estándares empleados como DPPH, ABTS y Trolox® fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Otras sustancias químicas como etanol 96°, metanol, sulfato de sodio anhidro, Polisorbato 20, así como dimetilsulfóxido (DMSO), fue proporcionado por el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”.

- **Equipos:**

Espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific TM GENESYS 10S), agitador vórtex (SCIOLOGEX MX-S), balanza analítica (PESACON).

5.8.1. Ensayo de captación del radical DPPH

a) Preparación de la solución de DPPH⁷¹

Para la obtención de la solución stock se preparó 20 mg de DPPH con 50 mL de metanol obteniéndose la concentración de 40mg/ 100mL; se guardó la solución en un frasco de vidrio de color ámbar y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Se preparó la solución de trabajo DPPH midiéndose 1,7mL de solución stock de DPPH llevándolo a un volumen final de 20mL con metanol. Se midió la absorbancia a 517 nm obteniéndose una absorbancia entre 0,600-0,700.

b) Preparación de las concentraciones de muestra

Inicialmente se midió la absorbancia del control (800 µL de solución de trabajo DPPH• con 400 µL de etanol absoluto). Las soluciones de aceite esencial se prepararon a diferentes concentraciones: 0.5%, 1%, 2% y 4%; utilizando etanol absoluto para su miscibilidad. Se realizó la conversión final a mg/mL con ayuda de previamente el cálculo de la densidad del aceite, teniendo las concentraciones de: 1.452, 2.903, 5.807 y 11.613 mg/mL respectivamente.

Se prepararon varios tubos de ensayo con mezcla de soluciones, la preparación de cada uno de los tubos se resume en la Tabla 6, luego de ello se agitaron e incubaron cada uno de los tubos de ensayo a temperatura ambiente en la oscuridad por un tiempo de 30 minutos. Adicionalmente se preparó un blanco de muestra (un tubo correspondiente para cada concentración de aceite esencial) que contenía 800 µL de metanol y 400 µL del aceite esencial.

Se midieron las absorbancias de las reacciones en espectrofotómetro de luz UV-visible a 517 nm, los ensayos se efectuaron por triplicado.

Tabla 6. Preparación de tubos para la posterior lectura mediante método DPPH•

COMPONENTES DE REACCIÓN	Tubo control DPPH•	Tubo blanco	Tubo muestra a diferentes concentraciones
Muestra (A.E.)	-	-	400 µL
Sol. trabajo DPPH•	800 µL	-	800 µL
Metanol	-	800 µL	-
Etanol absoluto (solvente de la muestra)	400 µL	400 µL	-

Así también se evaluó el % de inhibición de DPPH• con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{Abs.control DPPH}^\bullet - \text{Abs.Muestra})}{\text{Abs. Control DPPH}^\bullet} \times 100$$

Los resultados se expresan en su IC₅₀ que es explicado como la concentración efectiva del antioxidante que se requiere para reducir la concentración inicial del radical en un 50% y en TEAC, que quiere decir, actividad antioxidante equivalente a Trolox® (µg/mg de muestra peso fresco); éste se determina dividiendo el IC₅₀ del Trolox® con el IC₅₀ del aceite, en las unidades mencionadas.

5.8.2. Ensayo mediante captación del radical ABTS •+

a) Preparación de la solución stock de ABTS•⁺ ⁷²

Para la obtención de la solución ABTS•⁺, se preparó una solución acuosa stock de ABTS 7mM con persulfato de potasio 2.45mM. Esta solución resultante se dejará reaccionar por 16h en oscuridad y a temperatura ambiente.

La solución de trabajo de ABTS•⁺ se preparó diluyendo con agua bidestilada hasta alcanzar una absorbancia de $0,700 \pm 0,02$ a 734nm.

b) Preparación de las concentraciones de muestra

Inicialmente se midió la absorbancia del control (980 µL de solución de trabajo ABTS•⁺ con 20 µL de etanol absoluto). Las soluciones de aceite esencial se prepararon a diferentes concentraciones: 3.125%, 6.25% y 12.5%; utilizando etanol absoluto para su miscibilidad. Se realizó la conversión final a mg/mL con ayuda de previamente el cálculo de la densidad del aceite, teniendo las concentraciones de: 0.544, 1.089 y 2.178 mg/mL respectivamente.

Para la posterior medición de las absorbancias se colocaron en tubos de ensayo, la preparación de cada uno de los tubos se resume en la Tabla 7, luego se agitaron e incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad por un tiempo de 7 minutos. Se manejó un tubo blanco o tubo de calibración (20 µL de etanol absoluto con 980 µL de agua bidestilada).

Posterior a ello se midieron las absorbancias de las reacciones en espectrofotómetro de luz UV-visible a 730 nm, los análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 7. Preparación de tubos para la posterior lectura mediante método de captación del radical ABTS^{•+}

COMPONENTES DE REACCIÓN	Tubo control ABTS ^{•+}	Tubo blanco	Tubo muestra a diferentes concentraciones
Muestra (A.E.)	-	-	20 µL
Sol. trabajo ABTS ^{•+}	980 µL	-	980 µL
Agua bidestilada	-	980 µL	-
Etanol absoluto (solvente de la muestra)	20 µL	20 µL	-

Así también se calculó el porcentaje de inhibición de ABTS^{•+} (%) con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{Abs.control ABTS}^{\bullet+} - \text{Abs.Muestra})}{\text{Abs. Control ABTS}^{\bullet+}} \times 100$$

Los resultados se expresan en TEAC, que quiere decir, actividad antioxidante equivalente a Trolox y concentración inhibitoria media (IC₅₀).

5.9. Microorganismos y condiciones de crecimiento

Para los ensayos realizados de actividad antimicrobiana y efecto fungistático se usaron microorganismos que son cultivos estándar ATCC. Los microorganismos empleados fueron los siguientes: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suministrados por el Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM y *Candida albicans* (ATCC 10231) suministrado por el Centro de Control Analítico (CCA) de CENPROFARMA de la UNMSM.

Las cepas bacterianas fueron cultivadas de stock congelados y conservados en placas con agar Mueller Hinton en condiciones aeróbicas a 37°C durante 24 horas; mientras que la cepa de *Candida albicans* fue cultivada de stock congelado y conservado en placas con agar dextrosa Sabouraud al 4% en condiciones aeróbicas a 37°C por 48 horas. Previo a la preparación de los inóculos de las cepas

en mención se realizó una caracterización fenotípica de cada una de las especies de los microorganismos empleados como parte de un control de calidad previo, estos se detallan en el Anexo N°11.

5.10. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Existe una variedad de métodos de laboratorio para evaluar o detectar la actividad antimicrobiana in vitro de un extracto, aceite esencial o un compuesto puro. Los métodos más conocidos y básicos son los métodos de difusión en disco/ pozos de agar y de dilución de caldo o agar⁷³.

Se realizó la evaluación de la acción antimicrobiana frente a las cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus*; realizándose preliminarmente por el método de difusión en agar, y posteriormente, a los resultados que presentan actividad significativa se evaluó su Concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de microdilución colorimétrica en microplaca.

- **Reactivos e insumos químicos:**

El estándar de amoxicilina usado para el método de difusión en agar fue suministrado por Thermo Scientific™ (OXOID) y para microdilución colorimétrica fue suministrado por Laboratorios IQFARMA, en caso del estándar fluconazol para el método de difusión en agar, los discos fueron suministrados por Bioanalyse QC y para microdilución colorimétrica fue adquirido de Laboratorios IQFARMA. El medio de cultivo RPMI 1640 (con glutamina, con rojo de fenol y sin bicarbonato) fue obtenido de Sigma-Aldrich Chemical Co y resazurina suministrado por HIMEDIA. Adicionalmente los reactivos dimetilsulfóxido (DMSO), MOPS y todos los medios de cultivo empleados (Agar Sabouraud, NaCl 0.9%, Caldo TSB, Agar Mueller Hinton) fue proporcionado por el Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”.

- **Equipos:**

Autoclave MC-30LDP AC 220V (ALP), balanza analítica (Sartorius AG Germany CPA224S), balanza eléctrica Henkel 1000/0.01g, estufa (H. Wkessel S.A.), incubadora (XMTD series TEM CONT), microondas (ROYAL), refrigeradora (Bosch

220V, Coldex), agitador vórtex (DLAB MX-S), Cabina de flujo laminar (Telstar Bio II Advance).

5.10.1. Método de difusión en agar

Este método de difusión en disco o en pozo está estandarizado y recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS. Está basada en el método original de Kirby-Bauer⁷⁴.

Se basa en la correlación entre la concentración del compuesto necesario para inhibir una cepa bacteriana frente al halo de inhibición de crecimiento que se genera en la superficie de una placa con un medio de cultivo apropiado, incubándose en condiciones que dependen del microorganismo de investigación; el agente antimicrobiano o sustancia a evaluar se difunde en el medio de agar, inhibiendo el desarrollo de la cepa microbiana probada⁷³.

a) Preparación del inóculo

Se preparó la suspensión del inóculo en solución salina 0.85% estéril y se reguló la turbidez comparándose con el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland u hasta obtener una absorbancia de 0.1 a 540 nm, equivalente al inóculo deseado de $1-1.5 \times 10^8$ ufc / mL, se utilizaron a los microorganismos desarrollados en los medios selectivos Agar Mac Conkey y Agar Manitol Salado a 37°C para *Escherichia coli* durante 18-24h y *Staphylococcus aureus* por 72h respectivamente⁷⁵.

b) Preparación e inoculación de las placas

Se realizó la prueba de promoción de crecimiento de los medios según USP 42 <51> antes de siembra de los inóculos, para evaluar si el medio usado es capaz de permitir el crecimiento microbiano, donde el recuento obtenido fue al menos 50% del valor calculado para un inóculo estandarizado.

Se utilizó el agar Mueller Hinton previamente reconstituido, esterilizado y mantenido a una temperatura de 45°C para ambos microorganismos *E. coli* y *S. aureus*. Se agregó el inóculo preparado en el paso anterior (a) en volumen de 1mL de inóculo por cada 100mL de medio de cultivo, se homogenizó y distribuyó una

cantidad aproximada de 20mL en cada una de las placas de plástico estériles con diámetros de 90 mm. Se solidificaron a temperatura ambiente y se rotularon con el nombre de cada uno de los microorganismos testigos. Finalmente, se realizaron pozos en cada placa con un sacabocado de 9mm de diámetro, en cada placa se hizo entre 2 o 3 pozos equidistantes⁷⁵.

c) Incorporación de la muestra e incubación de las placas

Se agregó 100µL del aceite esencial a cada pocillo, preparado a diversas proporciones (100%, 75%, 50% y 25%) con DMSO como disolvente, y se dejó durante 60 minutos a temperatura ambiental con el objetivo que el aceite difunda en la placa. Posteriormente se realizó la incubación a 37°C por 24h para *E. coli* y *S. aureus*.

Se empleó DMSO como blanco negativo para verificar el efecto de inhibición en el crecimiento de los microorganismos evaluados, ya que éste se usó como disolvente en la preparación de las concentraciones de la muestra. Se usó como control positivo de actividad antimicrobiana a discos de amoxicilina de la concentración de 20mcg en comparación con los microorganismos bacterianos (*S. aureus* y *E. coli*).

d) Lectura e interpretación de resultados

Se observó y se midieron los halos (zonas claras de inhibición de crecimiento) en mm. Los experimentos se efectuaron por triplicado, y los resultados fueron expresados como el promedio de las 3 medidas.

Se midió el diámetro total (diámetro del pozo y del halo) que se obtendrán tras 24 horas de incubación a las temperaturas indicadas, clasificando según los resultados obtenidos del diámetro total a los microorganismos como sensibles (S), intermedios (I) y resistentes (R), esta clasificación se detalla en la Tabla 8⁷⁶. Si se presentó actividad antimicrobiana significativa, se determinó su CMI. Se consideró una acción antimicrobiana significativa si presenta un halo de inhibición mayor a 18 mm, empleando una concentración de 25mg/mL⁷⁵.

Tabla 8. Criterio de Evaluación de actividad antimicrobiana por método de difusión en agar⁷⁶.

Actividad antimicrobiana	Diámetro del halo (mm)
SENSIBLE (Alta)	≥ 20
INTERMEDIA(Moderada)	15- 19
RESISTENTE(Baja)	≤ 14

5.10.2. Método de microdilución colorimétrica en caldo

En este método de microdilución estandarizado se adiciona un indicador de viabilidad celular, el colorante resazurina (indicador redox), donde las células de los microorganismos reducen pasando de un color no fluorescente resazurina (azul) a color fluorescente resorufina (rosa), y pudiendo reducirse aún más al compuesto hidroresorufina incolora y no fluorescente^{77,78}. Esto se fundamenta en que la resazurina actúa como un aceptor de electrones intermedio en la cadena de transporte de electrones, al sustituir oxígeno molecular como aceptor de electrones. En la figura 22 se muestra la estructura de la resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido), que a causa de enzimas reductasas de células viables reducen la resazurina a su producto metabólico desoxigenado resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona), que es un color altamente fluorescente (rosa) presentando longitudes de onda superiores a 550 nm^{79,80}.

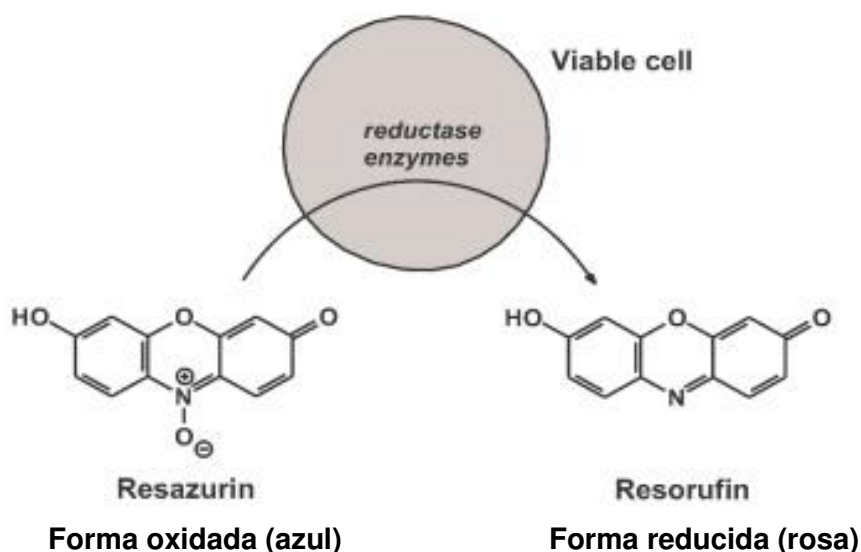


Figura 22. Estructuras químicas de resazurina y resorufina⁸⁰.

a) Selección de microorganismos

Se seleccionaron a las bacterias que en la prueba preliminar de difusión en agar mostraron actividad significativa, seleccionando así a la cepa bacteriana *S. aureus* (ATCC 25923).

b) Preparación del inóculo

Con el objetivo de lograr un superior contenido de células viables de *S. aureus*, se hizo un repique de dicho microorganismo 24h antes de la realización de la prueba de microdilución colorimétrica. El día que se realizó la prueba, se suspendió el microorganismo en NaCl 0.85% estéril y se ajustó la turbidez comparándose con el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland, que equivale al inóculo deseado de $1-1.5 \times 10^8$ ufc/mL para *S. aureus*. Se prosiguió con una doble dilución de 1:30 (inóculo: caldo) y 1:5 (primera dilución: caldo) con el caldo Mueller Hinton; hasta obtener una concentración de 1×10^6 ufc/mL (inóculo 2x)^{76,81,82}.

c) Preparación del indicador

Se preparó el indicador Resazurina a una concentración de 20mg/mL, para ello se pesó de manera aséptica 200mg de resazurina aforándose con agua destilada estéril para una solución de 10mL, posteriormente se filtró con ayuda de un filtro

de tamaño de poro de 0.22 μ m. Finalmente se conservó en un vidrio estéril color ámbar y refrigerado hasta su uso⁸².

d) Inóculo con indicador Resazurina

Se agregó resazurina al inóculo en la razón de 50 μ L de la solución de resazurina 20mg/mL por cada 10mL de inóculo 2x⁸².

e) Preparación de la muestra

El aceite esencial se diluyó en el medio de cultivo Mueller Hinton a una concentración de 80 μ L/mL empleando el 2% de DMSO para emulsionar el aceite. Las muestras se diluyeron a 9 diluciones doblemente concentradas, las concentraciones finales en los pozos fueron de 0.3125 μ L/mL-80 μ L/mL⁷⁶.

f) Preparación de los controles

Se preparó el control de esterilidad mezclando las proporciones de caldo Mueller Hinton con indicador resazurina, en la proporción de 50 μ L de la solución de resazurina por cada 10mL de caldo Mueller Hinton^{76,81}. El control positivo fue amoxicilina, la amoxicilina fue preparada a 640 μ g/mL, siguiendo las normas del CLSI a una concentración mínima 10 veces mayor que la concentración probada, en este caso 64 μ g/mL. La concentración del control fue de 0,5-64 μ g/mL.

g) Procedimiento

Se realizó en microplacas estériles de 96 pocillos, de fondo en U (Brand). La distribución y colocación de las muestras fue por triplicado por muestra en sentido horizontal teniendo en cuenta el diseño de la bandeja de microdilución⁸³, tal como se detalla en Figura 23. En los pocillos que correspondían a las muestras (B3-B11, C3-C11, D3-D11) y al control Amoxicilina (F3-F11), se colocan:

- 100 μ L de las diluciones doblemente seriadas de las muestras o control correspondiente con 100 μ L de inóculo 2x que contiene el indicador resazurina.

En la columna (B1-D1 y F1) se colocó 200 μ L de control de esterilidad (medio Mueller Hinton con resazurina). En la columna 12 (B12-D12 y F12) se colocan 200

μL de control de crecimiento (100 μL del medio Mueller Hinton con 100 μL del inóculo 2x con indicador Resazurina).

h) Lectura e interpretación de los resultados

Se procedió a incubar la microplaca en la incubadora a 37°C por un tiempo de 24h. Las lecturas se determinaron de visualmente, donde el viraje de color de azul-púrpura a rosado rojizo o incoloro se registró como crecimiento bacteriano positivo y la concentración menor a la cual se conservó la coloración azul-púrpura, sin que se genere cambio de color se tomará como el valor de la CMI^{76,81}. Se procedió con las recomendaciones de Wiegand I. y col. para realizar una correcta lectura⁸¹. El promedio de los 3 valores fue calculado y reportado como la CMI⁸².

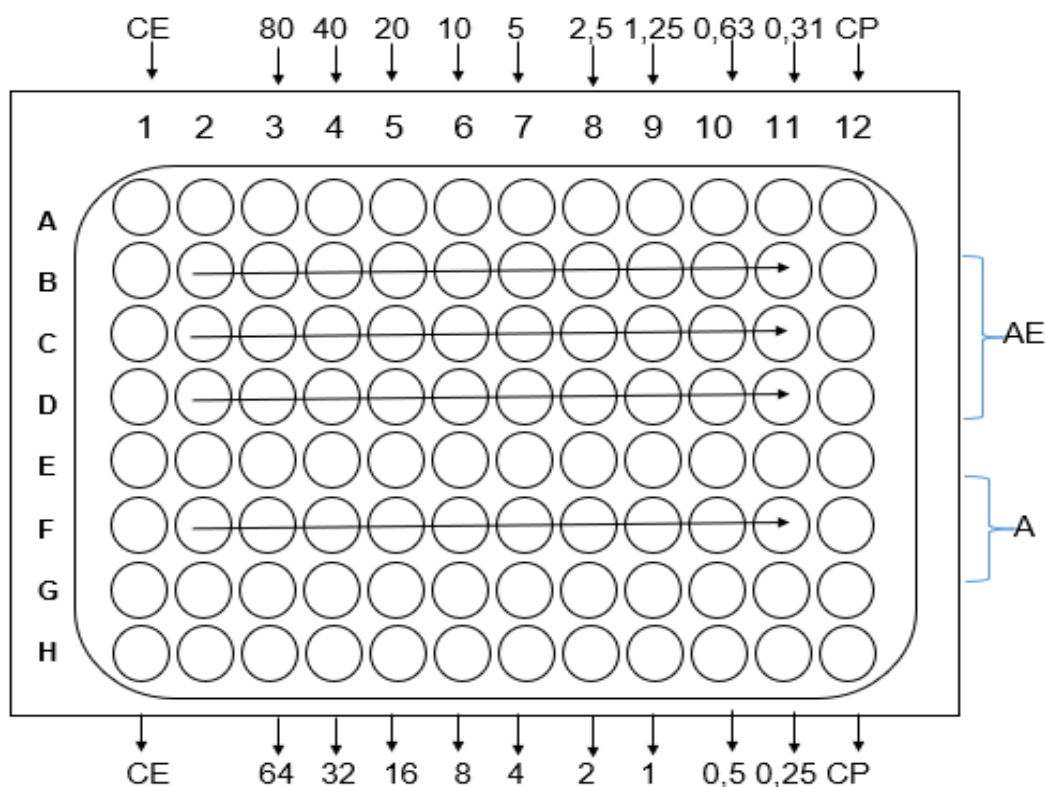


Figura 23. Diseño representativo del ensayo antimicrobiano en placa de microdilución de 96 pocillos del aceite esencial y del estándar de referencia.

Donde: CE, control de esterilidad (solo caldo); CP, control positivo (caldo con inóculo microbiano, sin muestra); AE, aceite esencial; A, Amoxicilina. Unidad: $\mu\text{L/mL}$ (B-D), $\mu\text{g/mL}$ (F).

Fuente: Tomado y modificado de Biesiadecki BJ, Jin JP⁸³.

5.11. Evaluación del efecto fungistático

Se realizó la evaluación del efecto fungistático frente a la cepa de *C. albicans*; realizándose preliminarmente por el método de difusión en agar, y posteriormente, si ésta presenta actividad significativa se determinó la CMI mediante el método de microdilución colorimétrica en microplaca (similar a lo realizado en la actividad antimicrobiana).

5.11.1. Método de difusión en agar

a) Preparación del inóculo

Se utilizó a la levadura crecida en Agar dextrosa de Sabouraud a temperatura ambiente durante 24-72h, posteriormente se suspendió en NaCl 0.85% estéril y se ajustó la turbidez comparándose con el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland, equivalente al inóculo deseado de $1-1.5 \times 10^8$ ufc/mL para *C. albicans*⁷⁵.

b) Preparación e inoculación de las placas

Al igual que el caso de los medios para crecimiento bacteriano, se realizó la prueba de promoción de crecimiento de este medio según USP 42 <51> antes de siembra del inóculo fúngico, donde el recuento obtenido fue al menos 50% del valor calculado para un inóculo estandarizado. Se utilizó el medio agar dextrosa Sabouraud a una temperatura de 45°C para la levadura *C. albicans*. Se adicionó el inóculo preparado en volumen de 1mL de inóculo por cada 100mL de medio de cultivo y se distribuyó una cantidad aproximada de 20mL en cada placa de plástico estériles con diámetros de 90 mm. Se dejaron solidificar y se rotularon. Posteriormente, se hicieron de 2 a 3 pozos equidistantes en cada placa con un sacabocado de acero de 9mm de diámetro externo.

c) Incorporación de la muestra e incubación de las placas

A cada pocillo de las placas, se agregó 100μL del aceite esencial preparado a diversas proporciones con DMSO como disolvente, a las proporciones de 100%, 75%, 50% y 25%, y se dejó reposar con el objetivo que el aceite difunda en el agar. Posterior a ello, se llevó a incubación a temperatura ambiente por 24h-72h.

Se empleó el solvente DMSO como blanco para verificar el efecto de inhibición en el crecimiento de la levadura, debido a que éste se usó en la preparación de concentraciones del aceite esencial. Se usó como control positivo discos de fluconazol (25mcg/disco).

d) Lectura e interpretación de resultados

Se midieron los halos de inhibición de crecimiento en mm. Los experimentos se realizaron por triplicado, y se dió el promedio de las 3 medidas como resultado. La lectura se realizó midiendo el diámetro total (diámetro del pozo y del halo) visualizando el crecimiento luego de 24-72 h a temperatura ambiente. Según Rojas et. al., se presenta acción antifúngica significativa cuando presenta un halo mayor a 18mm empleando una concentración de 25mg/mL⁷⁵, se procedió a confirmarse hallando la CMI con la prueba de microdilución colorimétrica en placa.

5.11.2. Método de microdilución colorimétrica en caldo

El fundamento es el mismo que se encuentra detallado en la **sección 5.10.2**.

Por mostrar actividad significativa previamente, se procedió con determinar la CMI mediante el método de microdilución colorimétrica en caldo.

a) Preparación del inóculo

Con el objetivo de generar un mayor contenido de células viables de *C. albicans*, se realizó un repique de dicha levadura 48h antes de la realización de la prueba de microdilución colorimétrica. El día que se realizó la prueba, se suspendió la levadura en solución salina 0.85% estéril y se ajustó la turbidez comparándose con el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland u hasta obtener una absorbancia de 0.1 a 540 nm, equivalente al inóculo deseado de $1-5 \times 10^6$ ufc/mL. Luego se realizó una doble dilución de 1:50 (inóculo: caldo) y 1:20 (primera dilución: caldo) con el medio RPMI 1640; hasta obtener una concentración de $1-5 \times 10^3$ ufc/mL (inóculo 2x)^{76,81,82}. Posteriormente se agregó resazurina al inóculo en la razón de 50µL de la solución de resazurina 20mg/mL por cada 10mL de inóculo 2x⁸².

b) Preparación de la muestra para la prueba de microdilución

Se diluyó el aceite esencial en el medio RPMI 1640 a una concentración de 80µL/mL empleando el 2% de DMSO para emulsionar el aceite. Las muestras se diluyeron a 9 diluciones doblemente concentradas, el rango de concentraciones finales en los pozos fue de 0.3125µL/mL-80µL/mL⁷⁶.

c) Preparación de los controles

Se preparó el control de esterilidad mezclando las proporciones de medio RPMI 1640 con el indicador de resazurina^{76,81}. El control positivo utilizado para la prueba fue fluconazol, que solubilizado en agua fue preparado a 640µg/mL, siguiendo las normas del CLSI a una concentración mínima 10 veces mayor a la concentración a ser probada, en este caso 64µg/mL. La concentración del control fue de 0,5-64µg/mL.

d) Procedimiento

Se tiene en cuenta el diseño de la bandeja de microdilución (Figura 24)⁸³. En los pozos correspondientes a las muestras (B3-B11, C3-C11, D3-D11) y al control Fluconazol (F3-F11), se colocan:

- 100µL de las diluciones doblemente seriadas de las muestras o control correspondiente (por ejemplo, para el pocillo F3 se colocó 100 µL de 64 µg/mL fluconazol) con 100 µL del inóculo 2x que contiene el indicador resazurina.

En la columna (B1-D1 y F1) se colocó 200 µL de control de esterilidad (medio RPMI 1640 con resazurina). En la columna 12 (B12-D12 y F12) se colocan 200 µL de control de crecimiento (100 µL del medio RPMI 1640 con 100 µL del inóculo 2x con indicador resazurina).

e) Lectura e interpretación de los resultados

Se incubó a 37°C durante 24h. La lectura fue visual, siguiendo los mismos principios empleados en la actividad antimicrobiana (ítem h, sección 5.10.2).

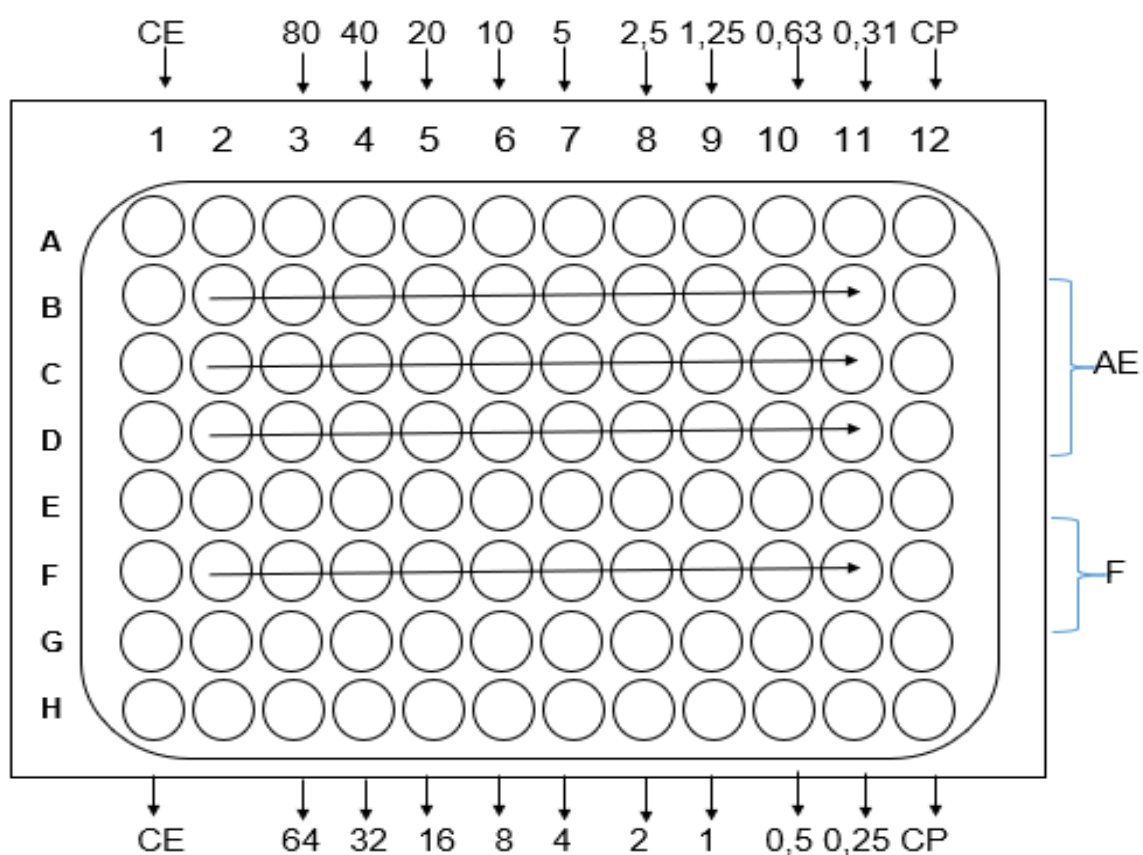


Figura 24. Diseño representativo del ensayo de efecto fungistático en placa de microdilución de 96 pocillos del aceite esencial y del estándar de referencia.

Donde: CE, control de esterilidad (solo caldo); CP, control positivo (caldo con inóculo fúngico, sin muestra); AE, aceite esencial; F, fluconazol. Unidad: $\mu\text{L/mL}$ (B-D), $\mu\text{g/mL}$ (F).

Fuente: Tomado y modificado de Biesiadecki BJ, Jin JP⁸³.

5.12. Análisis estadístico

La evaluación de cada una de las actividades analizadas: antioxidante, antimicrobiana y fungistática se efectuó por triplicado en caso de las concentraciones del aceite esencial y duplicado en caso de estándares. Los resultados fueron procesados utilizando el software IBM SPSS 25, analizados estadísticamente mediante el método de análisis de varianza de un factor- ANOVA y la medición de comparaciones entre grupos se realizó con el análisis de rango múltiple de Tuckey. Los resultados son expresados como media +/- desviación estándar (DE). Los valores de IC₅₀ se hallaron mediante el análisis de regresión lineal.

6. RESULTADOS

6.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica y botánica de la especie botánica de la presente tesis fue realizada por el Biólogo Colegiado José Campos De La Cruz de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ésta se reporta en el anexo N°1.

La clasificación según el Sistema integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), se clasifica de la siguiente manera:

REINO : Plantae
DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUB-CLASE: Magnoliidae
ORDEN : Laurales
FAMILIA : Lauraceae
GÉNERO : *Persea*
ESPECIE : *Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez.

6.2. Datos de la zona de recolección

Los datos recolectados en la zona de recolección se resumen en la tabla adjunta (tabla 9).

Tabla 9. Ficha de recolección de "junjulí".

NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav.) Mez.
Nombre común	"junjulí", "pumapara", "aguacatillo"
Lugar de recolección	Departamento de Amazonas. Provincia Luya, distrito de Camporredondo. Localidad Pillías.
Hábitat	Árbol hasta de 20m de altura, crece en bosque montano. Cerca de charas, o en terrenos con vegetación en receneración.
Usos medicinales en la zona de recolección (forma de uso, preparación y parte usada)	Usado en la población para afecciones de inflamación de vías reproductoras y urinarias. Contra la cefalalgia (infusión de las hojas). La corteza es usada para entablillar huesos luxados o quebrados. También usado como sombra de cultivos de café, como madera para elaboración de muebles y leña.
Fecha de recolección	Agosto 2018

Elaboración: propia

6.3. Análisis preliminares

6.3.1. Análisis organoléptico

Líquido oleoso, ligeramente amarillento, aromático, de olor agradable y volátil.

6.3.2. Densidad

Tabla 10. Resultados de análisis de la densidad de *P. caerulea* por triplicado.

Análisis	1	2	3
P vacío (g)	8.8358	8.8351	8.8356
P muestra (g)	10.0459	10.0460	10.0455
P agua (g)	10.2249	10.2247	10.2246
Densidad	0.871	0.871	0.871
Densidad promedio	0,871 g/mL		

6.3.3. Ensayo de miscibilidad

Se determinó que el aceite esencial de *Persea caerulea* es miscible con los solventes: éter etílico, cloroformo, n-hexano, DMSO (dimetilsulfóxido) y etanol absoluto; poco miscible con los solventes n-butanol y acetato de etilo. Así mismo presenta escasa miscibilidad con acetona, metanol y etanol 96°.

Por los resultados obtenidos se decidió trabajar con los solventes DMSO y etanol absoluto por tener alta miscibilidad con el aceite esencial de junjolí.

6.4. Composición química del aceite esencial de *P. caerulea*

Se muestra el resultado probabilístico obtenido por el software del equipo GCMSsolution utilizando la librería NIST. Se midió la probabilidad por el SI (Similarity index) que se encuentra en cada espectro de masa (se muestra en la parte superior a la gráfica).

El componente principal del aceite esencial de *P. caerulea* detectado por ambos análisis fue el alfa-pineno (Tabla 11). El listado de componentes detectados mediante el análisis por Inyección Headspace y mediante el análisis por inyección líquida, se muestran en la tabla 12 y 13, respectivamente. Éstos se expresaron en porcentaje del área total.

Los resultados del GC-MS mostraron 31 componentes mediante el análisis por Inyección Headspace; que se presenta en la tabla 12; en los que cinco componentes representan el 88,15% del área total del pico en el cromatograma. Entre ellos tenemos: alfa-pineno (37,36%), beta-pineno (24,14%), alfa felandreno (14,22%), o-Cimeno (4,74%), beta-Mirceno (3,87%) y D-Limoneno (3,82%).

Se obtuvieron 90 componentes mediante el análisis por inyección líquida; que se presenta en la tabla 13; de los cuales ocho representan el 61,85%. Entre ellos tenemos: alfa-pineno (15,73%), alfa- felandreno (11,71%), beta-pineno (10,78%), Cariofileno (6,66%), (E)-beta-Farneseno (5,85%), o-Cimeno (4,73%), D-Limoneno (3,56%) y beta-felandreno (2,83%).

Tabla 11. Componente principal del aceite esencial de *Persea caerulea*

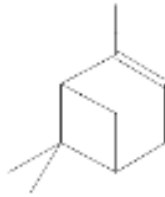
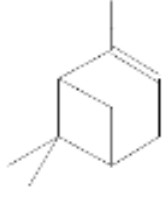
ACEITE ESENCIAL	COMPONENTE PRINCIPAL	
	<i>Análisis por Inyección Headspace</i>	<i>Análisis por Inyección Líquida</i>
<i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav.) Mez	<p>alfa- pineno</p>  <p>(Abundancia relativa: 37.36%)</p>	<p>alfa- pineno</p>  <p>(Abundancia relativa: 15.73%)</p>

Tabla 12. Composición química del aceite esencial de *P. caerulea* mediante análisis por Inyección Headspace.

Número	Componente ^a	Tiempo de retención(t _R) ^b	%Área (abundancia relativa) ^c
1	Furano, 2-etil	3.142	0.30
2	Furano, 2-etil-	3.240	0.07
3	Hexano, 2,4-dimetil-	5.015	0.39
4	Biciclo [3.1.0] hex-2-eno, 2-metil-5-(1-metiletil)	11.596	3.10
5	alfa-Pineno	12.380	37.36
6	Camfeno	13.381	1.37
7	beta-Pineno	16.696	24.14
8	beta-Mirceno	19.087	3.87
9	alfa-felandreno	20.738	14.22
10	3-Carene	21.389	1.50
11	gamma-Terpineno	21.706	0.08
12	Benceno, (3,3-dimetillbutilo)-	21.775	0.01
13	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletiliden	22.550	0.42
14	Benceno, 1-metil-3-(1-metiletil)-	23.635	0.07
15	o-Cimeno	24.140	4.74
16	D-Limoneno	24.827	3.82
17	Eucaliptol	25.033	0.45
18	trans- beta- Ocimene	27.704	0.87
19	1,3,6-Octatrieno, 3,7-dimetil-, (Z)-	29.899	0.80
20	gamma- Terpineno	31.384	0.49
21	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilend	35.766	0.09
22	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilend	35.985	1.17
23	Linalol	37.943	0.31
24	4-Hexen-1-ol, 5-metil-2-(1-metiletenill)-	39.686	0.03
25	Terpinen-4-ol	44.324	0.04
26	alfa-Cubebeno	54.551	0.02
27	Copaeno	55.801	0.03
28	Cariofileno	57.828	0.14
29	(E)- beta- Famesene	59.573	0.05
30	Spiro [5.5]undec-2-eno, 3,7,7-trimetil-11-me	59.710	0.02
31	Germacreno D	60.572	0.02
			100.00

^aComponentes listados en orden de elución de la columna GC RESTEK de tipo RTX-5ms.

^bTiempo de retención (min) calculados en la columna GC RESTEK de tipo RTX-5ms.

^cPorcentaje del área o abundancia relativa de la muestra (área de pico relativa al área del pico total en el cromatograma).

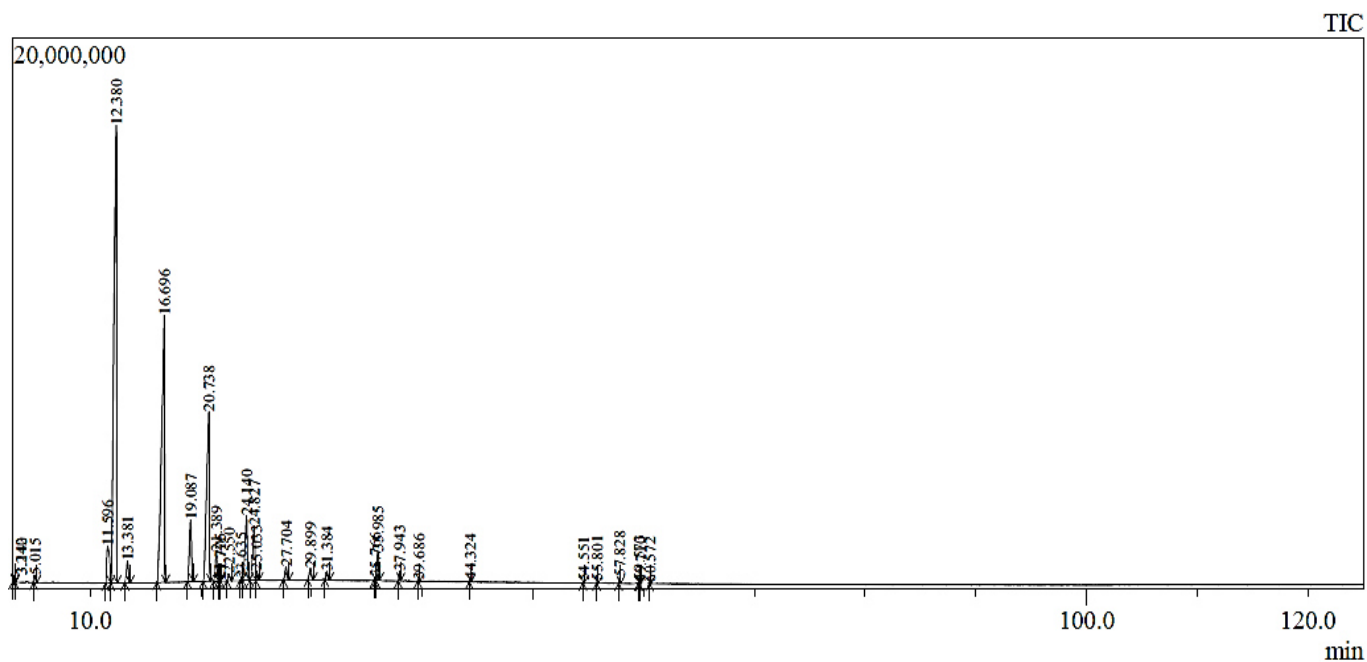


Figura 25. Cromatograma de Gas por Inyección Headspace del aceite esencial de *P. caerulea* “junjuli” de 3 a 120 minutos.

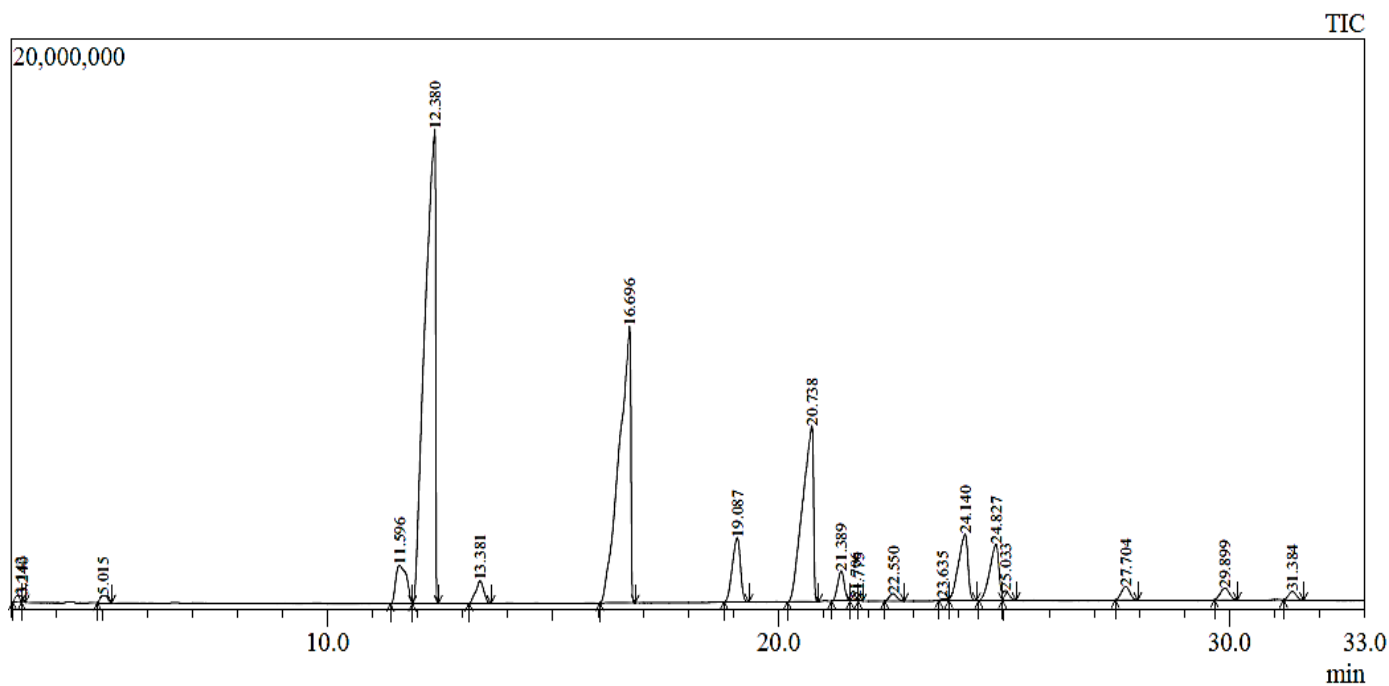


Figura 26. Primera parte del Cromatograma de Gas por Inyección Headspace del aceite esencial de *P. caerulea* “junjuli” de 3 a 33 minutos.

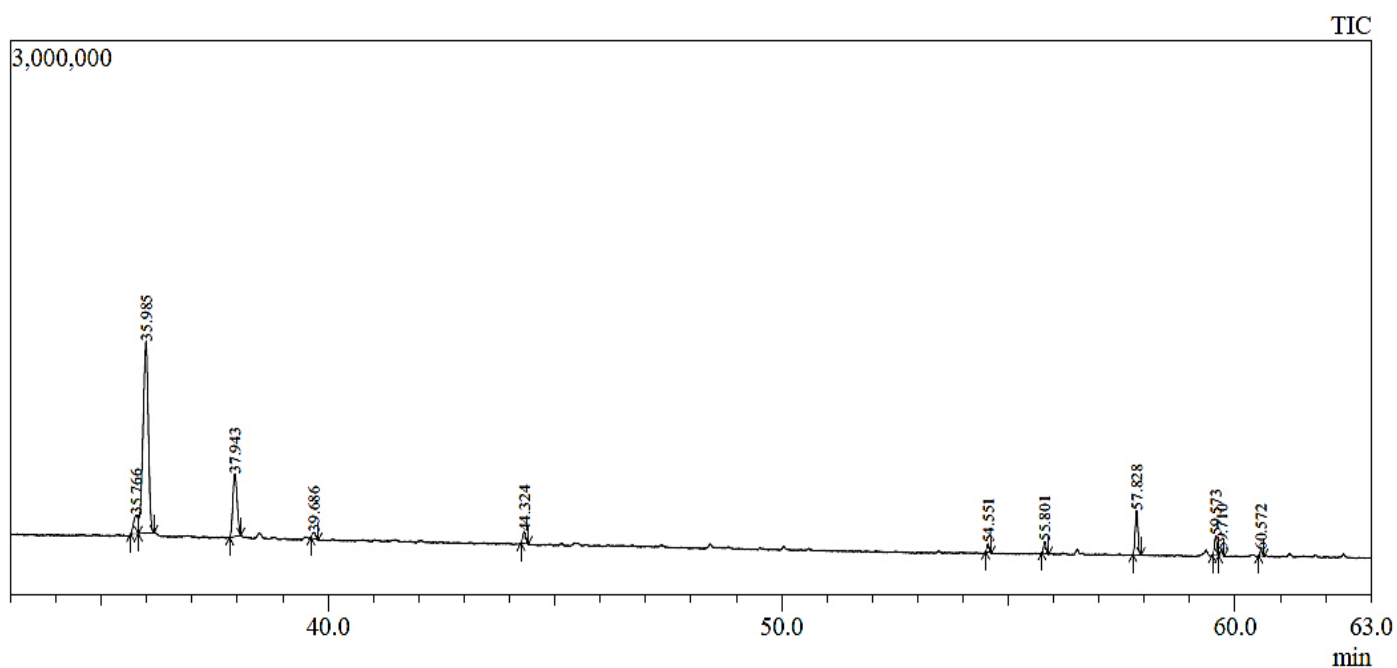


Figura 27. Segunda parte del Cromatograma de Gas por Inyección Headspace del aceite esencial de *P. caerulea* “junjuli” de 33 a 63 minutos.

Tabla 13. Composición química del aceite esencial de *P. caerulea* mediante análisis por Inyección Líquida.

Número	Componente ^a	Tiempo de retención(t _R) ^b	%Área (abundancia relativa) ^c
1	Octano	4.859	0.02
2	2-Pentanona, 4-hidroxi-4-metil-	6.358	1.03
3	Biciclo [3.1.0] hex-2-eno, 2-metil-5-(1-metiletil)	11.435	0.99
4	alfa-Pineno	11.999	15.73
5	Biciclo [2.2.1]heptano, 7,7-dimetil-2-metileno-	13.095	0.12
6	Camfeno	13.226	0.34
7	beta-felandreno	16.118	2.83
8	beta-Pineno	16.347	10.78
9	beta-Mirceno	18.863	2.59
10	alfa-felandreno	20.395	11.71
11	3-Careno	21.183	1.04
12	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilendieno)-	22.361	0.28
13	o-Cimeno	23.878	4.73
14	D-Limoneno	24.568	3.56
15	Eucaliptol	24.855	0.38
16	trans- beta- Ocimene	27.536	0.90
17	1,3,6-Octatrieno, 3,7-dimetil-, (Z)-	29.723	0.95
18	Gamma –Terpineno	31.275	0.56
19	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilidieno)-	35.685	0.14
20	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metiletilidieno)-	35.912	2.12
21	Linalol	37.904	1.15
22	Terpinen-4-ol	44.298	0.34
23	Benzenometanol, alfa, alfa,4-trimetil-	45.118	0.04
24	cis-3-Hexenil-alfa-metilbutirato	48.398	0.11
25	7-Oxabiciclo [4.1.0]heptano, 1-metil-4-(2-metilox	49.492	0.33
26	2-Decenal, (E)-	50.030	0.11
27	Citral o lemonal	50.573	0.08
28	5-Hepten-2-ona, 6-metil-	51.694	0.05
29	Biciclo (3.1.1) heptano-2,3-diol, 2,6,6-trimetil-	52.981	0.10
30	Ciclohexano, (1 -metiletil)-	53.458	0.12

31	Ciclohexano, 4-etenil-4-metil-3-(1-metiletenil	53.930	0.05
32	2- Acetonilciclohexanona	54.053	0.19
33	alfa- Cubebene	54.544	0.81
34	Ylangene	55.585	0.04
35	Alfa –Cubebene	55.801	1.30
36	(-)-beta- Bourbonene	56.210	0.09
37	Germacreno D	56.514	0.67
38	Ciclohexano, 1-etenil-1-metil-2,4-bis (1-metilet	56.615	0.22
39	1,2-Ciclohexanodiol, 1-metil-4-(1-metiletenil)-	56.781	0.12
40	10-Undecenal	57.124	0.14
41	Dodecanal	57.451	0.19
42	Biciclo [3.1.1]hept-2-eno, 2,6-dimetil-6-(4-metil-3	57.695	0.05
43	Cariofileno	57.854	6.66
44	Trans- Hidrato de sesquisabina	58.282	0.08
45	Biciclo [3.1.1]hept-2-eno, 2,6-dimetil-6-(4-metil-3	58.595	0.03
46	alfa- Guaieno	58.710	0.18
47	Humuleno	59.361	1.71
48	(E)-beta-Farneseno	59.596	5.85
49	Spiro [5.5]undec-2-eno, 3,7,7-trimetil-11-metileno	59.697	1.28
50	Epizonareno	60.270	0.06
51	gamma –Muuroleno	60.407	0.48
52	Germacreno D	60.577	2.00
53	Benceno, 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-	60.668	0.34
54	Naftaleno, decahidro-4a-metil-1-metileno-7-(1	60.802	0.22
55	Naftaleno, 1,2,3,5,6, 8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-	61.042	0.15
56	Biciclo [3.1.1]hept-2-eno, 2,6-dimetil-6-(4-metil-3	61.207	1.40
57	1H-Cicloprop[e] azuleno, 1a,2,3,4, 4a,5,6,7b-octahidr	61.348	0.10
58	alfa – Muuroleno	61.433	0.19
59	beta- Bisaboleno	61.531	0.41
60	Azuleno, 1,2,3,5,6,7,8, 8a-octahidro-1,4-dimetil-7-(1	61.655	0.12
61	beta- Bisaboleno	61.770	1.01
62	gamma- Muuroleno	62.002	0.40
63	Naftaleno, 1,2,3,5,6, 8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-	62.394	1.89

64	Naftaleno, 1,2,3,4, 4a,7-hexahidro-1,6-dimetil-4-	62.738	0.13
65	Aromandendreno	62.846	0.05
66	alfa- Muuroleno	62.971	0.05
67	Humuleno	63.166	0.15
68	Óxido de cariofileno	63.568	0.09
69	1,5-Ciclodeca dieno, 1,5-dimetil-8-(1-metiletilid	63.749	0.22
70	Ledol	63.868	0.06
71	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil-	64.026	2.33
72	1,13-Tetradecadieno	64.197	0.12
73	3-Hexen-1-ol, benzoato, (Z)-	64.337	0.19
74	Supraene	64.673	0.09
75	Óxido de cariofileno	64.909	1.57
76	2-Tetradecanona	65.149	0.15
77	2-Naftalenometanol, 2,3,4, 4a,5,6,7,8-octahidro-a	65.411	0.06
78	Guaiol o champacol	65.605	0.18
79	13-Octadecenal, (Z)-	65.879	0.08
80	2-Naftalenometanol, 2,3,4, 4a,5,6,7,8-octahidro-a	66.102	0.32
81	2-Naftalenometanol, 2,3,4, 4a,5,6,7,8-octahidro-a	66.840	0.14
82	Guaiol o champacol	66.978	0.51
83	Di- epi- alfa-cedreno-(I)	67.135	0.17
84	alfa- Cadinol	68.591	0.08
85	2-Naftalenometanol, 1,2,3,4, 4a,5,6,7-octahidro-a	68.754	0.56
86	ácido 2,6,10,14-hexadecatetraenoico, 3,7,11,15-tetramet	69.377	0.17
87	alfa-Bisabolol	70.374	0.09
88	Ácido erúcico	75.864	0.63
89	Fitol	91.797	0.12
90	Heneicosano	108.263	0.04
	Total		100.00

^aComponentes listados en orden de elución de la columna GC RESTEK de tipo RTX-5ms.

^bTiempo de retención (min) calculados en la columna GC RESTEK de tipo RTX-5ms.

^cPorcentaje del área o abundancia relativa de la muestra (área de pico relativa al área del pico total en el cromatograma).

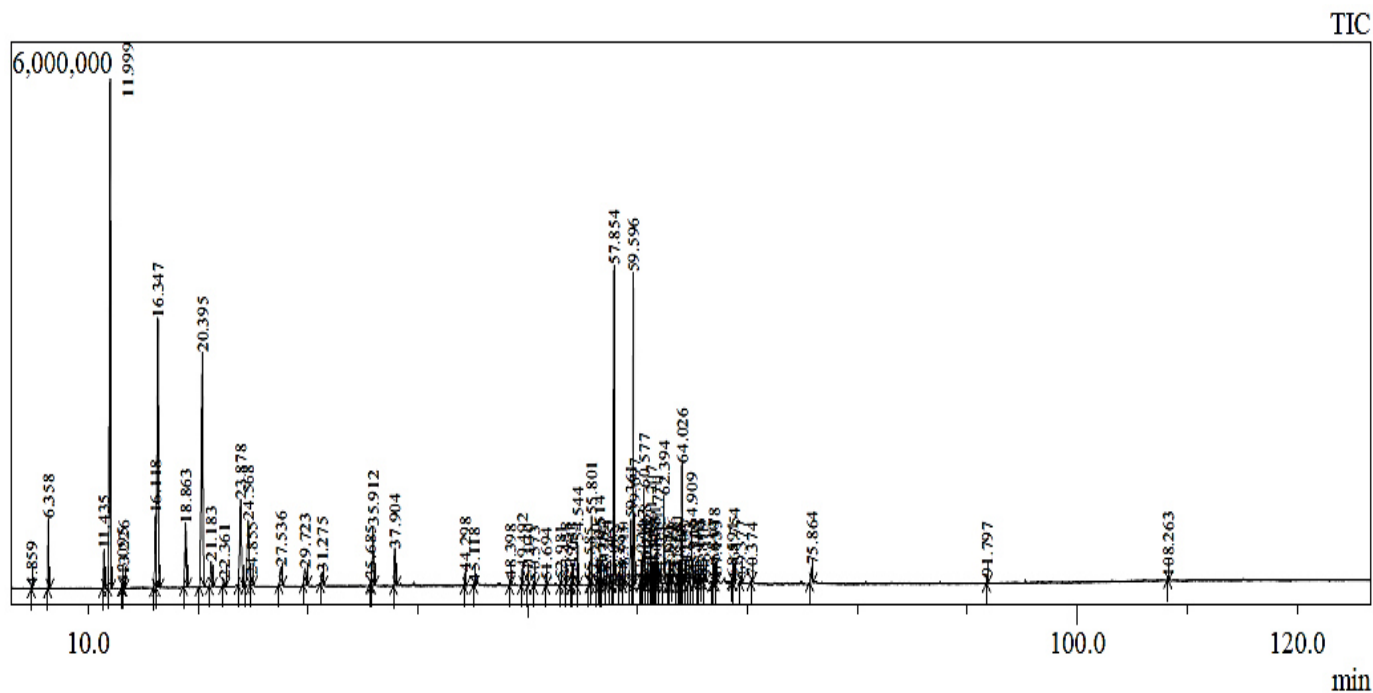


Figura 28. Cromatograma de Gas por Inyección líquida del aceite esencial de *P. caerulea* “junjulí” de 4 a 120 minutos.

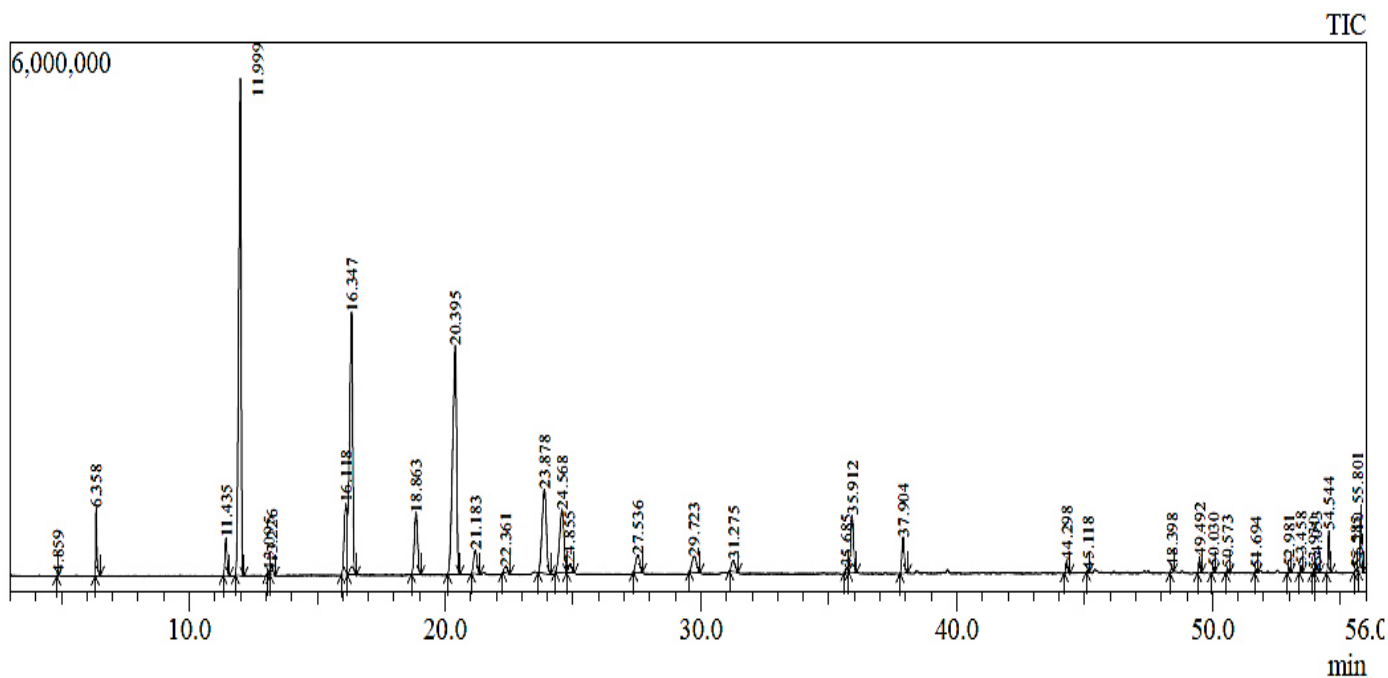


Figura 29. Primera parte del Cromatograma de Gas por Inyección líquida del aceite esencial de *P. caerulea* “junjulí” de 4 a 56 minutos.

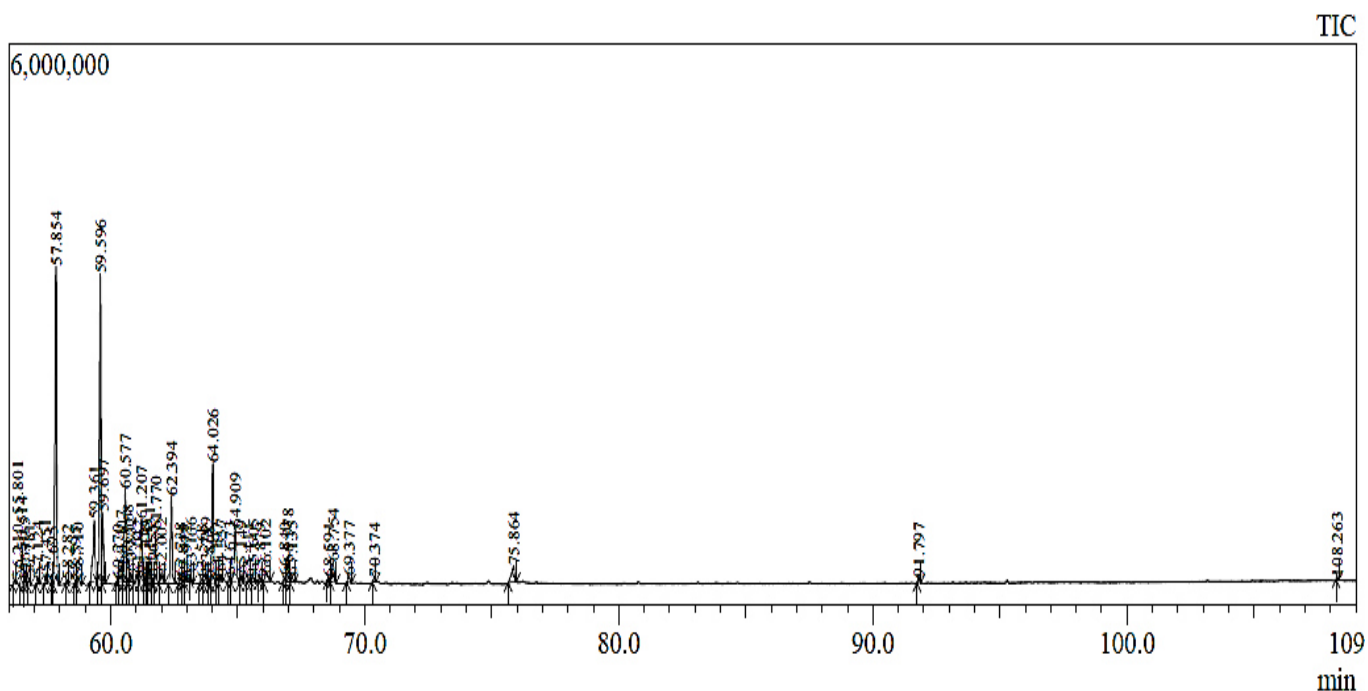


Figura 30. Segunda parte del Cromatograma de Gas por Inyección líquida del aceite esencial de *P. caerulea* “junjulí” de 56 a 109 minutos.

Los componentes que se encontraron en el aceite esencial de *Persea caerulea* Mez “junjulí” mediante el análisis por Inyección Headspace; se dividen en tres principales familias químicas: terpenoides (97.47%), fenilpropanoides (0.09%) y compuestos alifáticos (2.44%) (figura 31). Estos a su vez se dividen en 5 grupos químicos entre los cuales están: monoterpenoides oxigenados, hidrocarburos monoterpenoides, hidrocarburos sesquiterpenoides, fenilpropanoides y compuestos alifáticos. Los terpenoides pertenecen al porcentaje mayoritario con un 97.47% que incluyen en su contenido a hidrocarburos monoterpenoides (96.36%) con alfa-pineno, beta-pineno y alfa felandreno como los componentes principales de este grupo; en segundo lugar se encuentran los monoterpenoides oxigenados (0.83%) seguido de los hidrocarburos sesquiterpenoides (0.28%), no se encontró presencia de sesquiterpenoides oxigenados (figura 32).

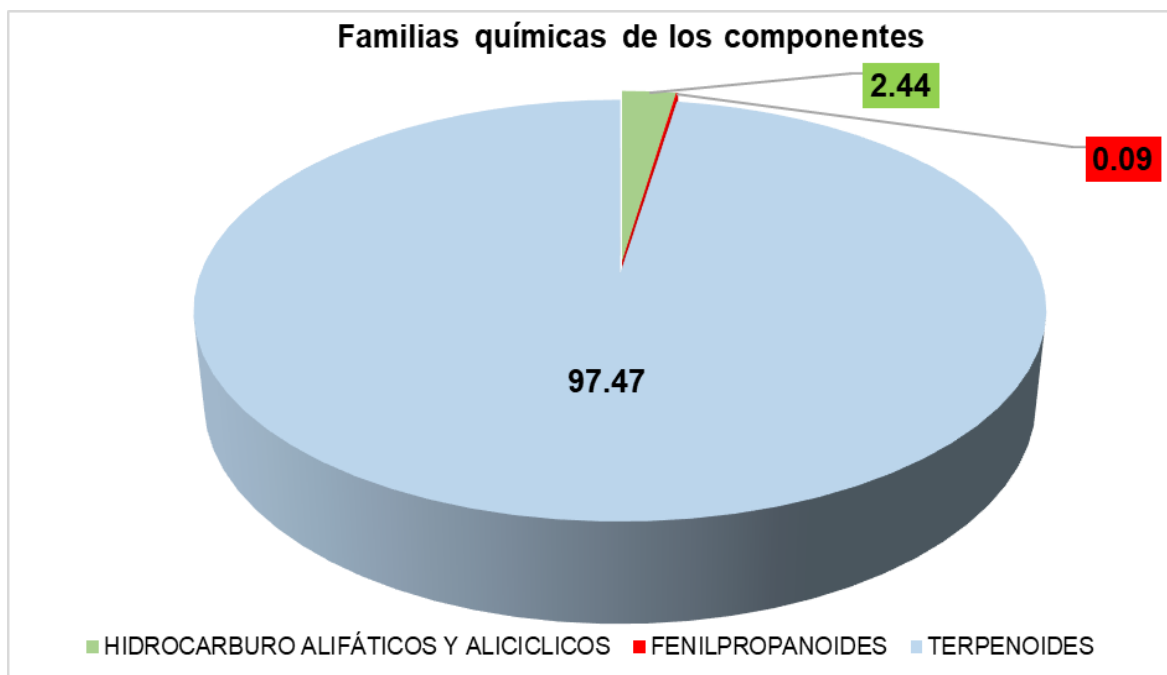


Figura 31. Distribución de las principales familias químicas de los componentes del aceite esencial de *P. caerulea*.

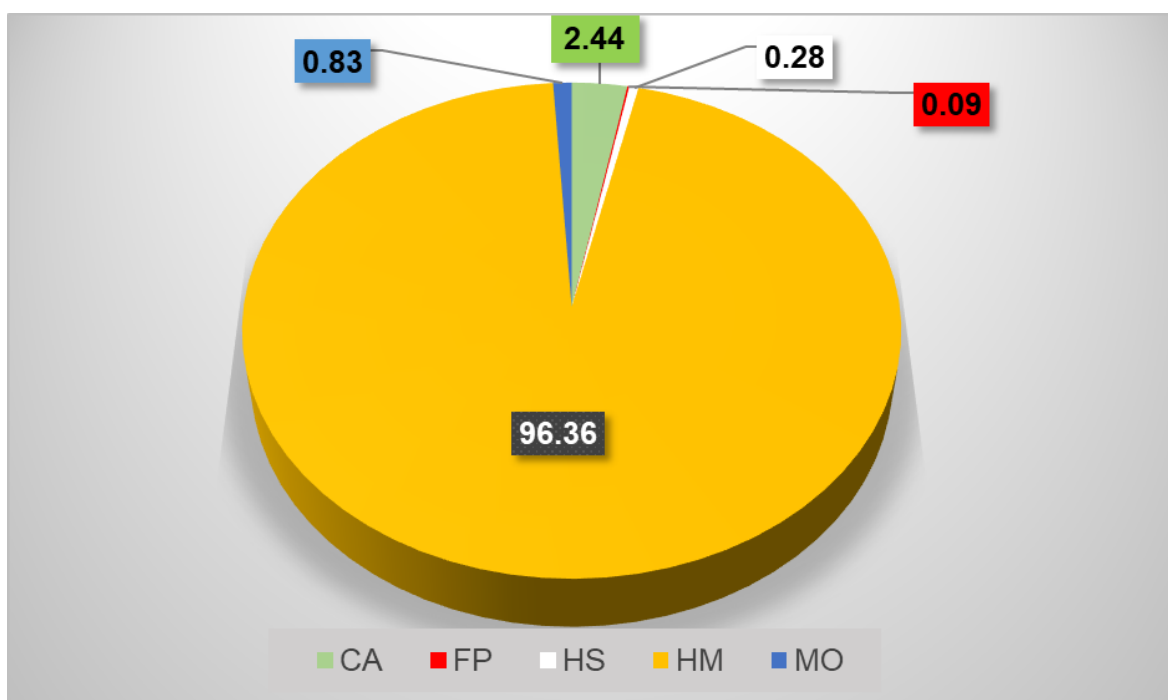


Figura 32. Distribución de los diferentes grupos químicos de los componentes del aceite esencial de *P. caerulea*.

Donde: CA: compuestos alifáticos; FP: fenilpropanoides; HS: hidrocarburos sesquiterpenoides; HM: hidrocarburos monoterpenoides; MO: monoterpenoides oxigenados.

6.5. Actividad antioxidante de *P. caerulea*

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del aceite esencial en estudio, que se evaluaron por los métodos de DPPH• y ABTS•+, fueron expresados mediante %inhibición o actividad antioxidante, valores de IC₅₀ y en unidades TEAC; como se detalla a continuación.

Los resultados obtenidos del aceite esencial y el estándar con respecto al % inhibición de los radicales DPPH• y ABTS•+ se muestran en el Anexo N°4 y N°5 respectivamente.

Los valores de IC₅₀ del aceite esencial obtenido en método del DPPH• y ABTS•+ fueron de 10613,965 µg/mL y 1288,415 µg/mL respectivamente; mientras que los valores de IC₅₀ de Trolox® fueron de 2,504 µg/mL y 3,053 µg/mL respectivamente. Por lo que se puede observar los datos obtenidos del aceite esencial son mayores con respecto al estándar (Trolox®), lo que significa que el aceite esencial de *P. caerulea* exhibió baja actividad antioxidante.

Tabla 14. Comparación de actividad antioxidante del aceite esencial de *P. caerulea* frente Trolox® expresada en concentración inhibitoria media IC₅₀.

MUESTRA	VALORES DE IC ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH•	ABTS•+
Aceite esencial de <i>P. caerulea</i>	10613,965	1288,415
Trolox®	2,504	3,053

Donde: Trolox® es el estándar de referencia

El resultado de valor de TEAC obtenido empleando el método de ABTS•+ fue 2,370 µg de Trolox / mg, mientras que el resultado obtenido del método de DPPH fue de 0,236 µg de Trolox / mg.

Tabla 15. Cálculo del TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) del aceite esencial de *P. caerulea* determinado a partir del IC₅₀.

MÉTODO	IC ₅₀ TROLOX (µg/mL)	IC ₅₀ MUESTRA (mg/mL)	VALOR DE TEAC (µg de Trolox / mg)
DPPH•	2,504	10,614	0,236
ABTS•+	3,053	1,288	2,370

En las figuras 33 y 34 se muestran las curvas de captación de radical DPPH• y ABTS•+ respectivamente, del aceite esencial de junjolí, expresados por concentración (mg/mL) vs. Absorbancia promedio obtenida; así también en las figuras 35 y 36 se expresan las concentraciones (mg/mL) con los valores de %inhibición; en ambos casos se obtuvieron coeficientes de determinación (R²) mayores a 0,9. Las gráficas demuestran una correlación lineal significativa entre la concentración del aceite esencial y % inhibición.

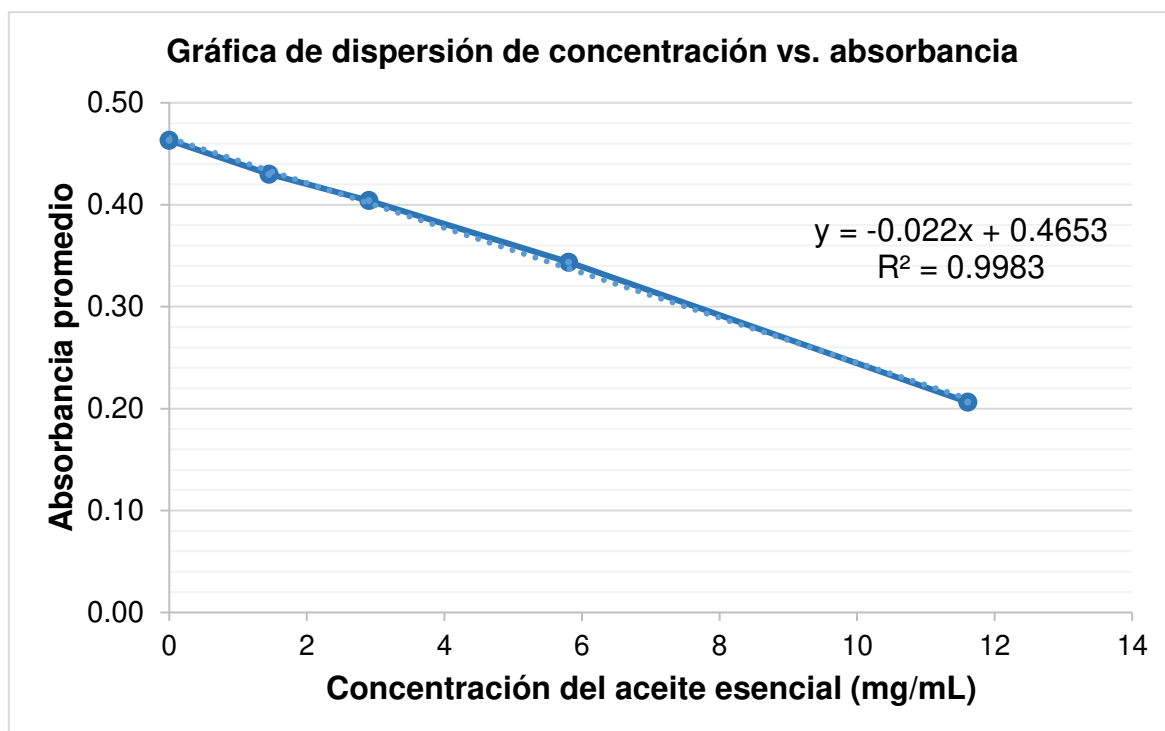


Figura 33. Curva de captación del radical DPPH• del aceite esencial de *P. caerulea* expresado en concentración con relación de su absorbancia.

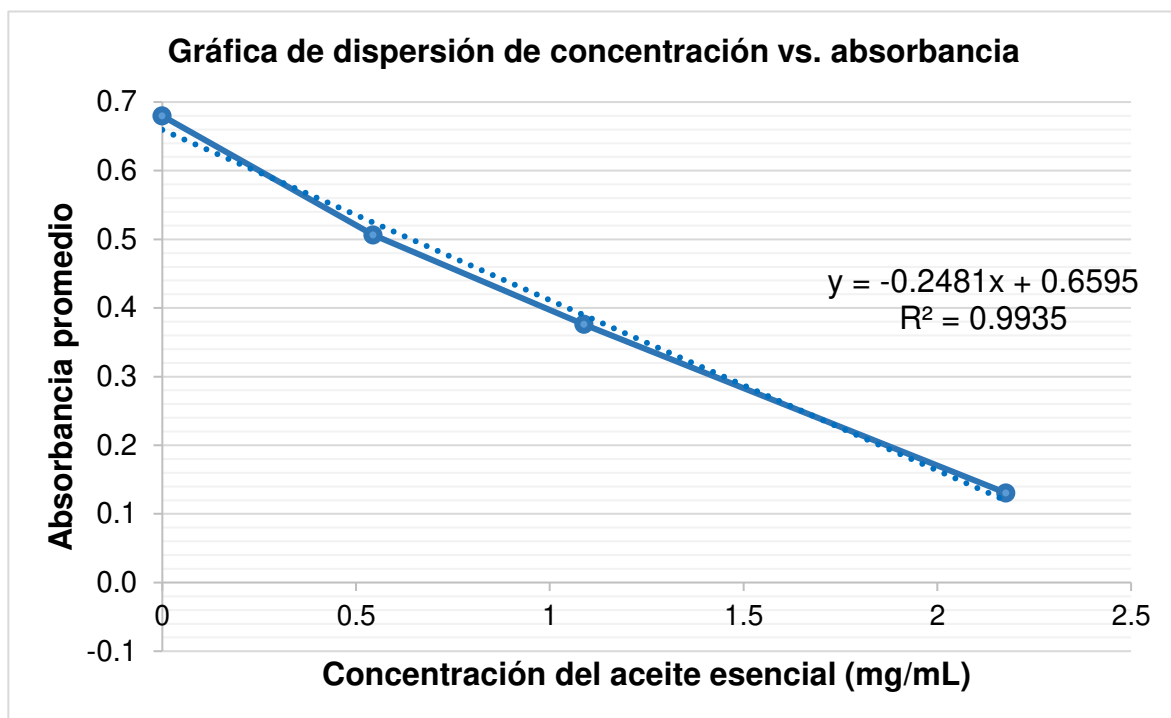


Figura 34. Curva de captación del radical $ABTS^{•+}$ del aceite esencial de *P. caerulea* expresado en concentración con relación de su absorbancia.

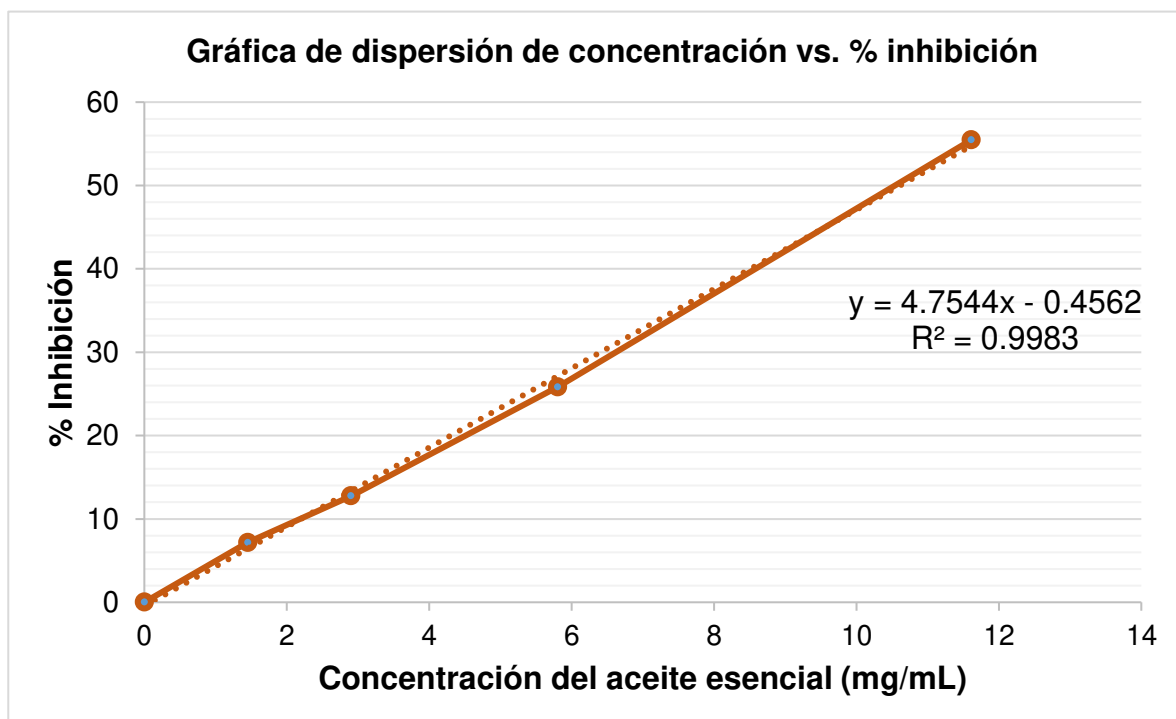


Figura 35. Curva de captación del radical $DPPH^{•}$ del aceite esencial de *P. caerulea* expresado en concentración con relación de su %inhibición o %actividad antioxidante.

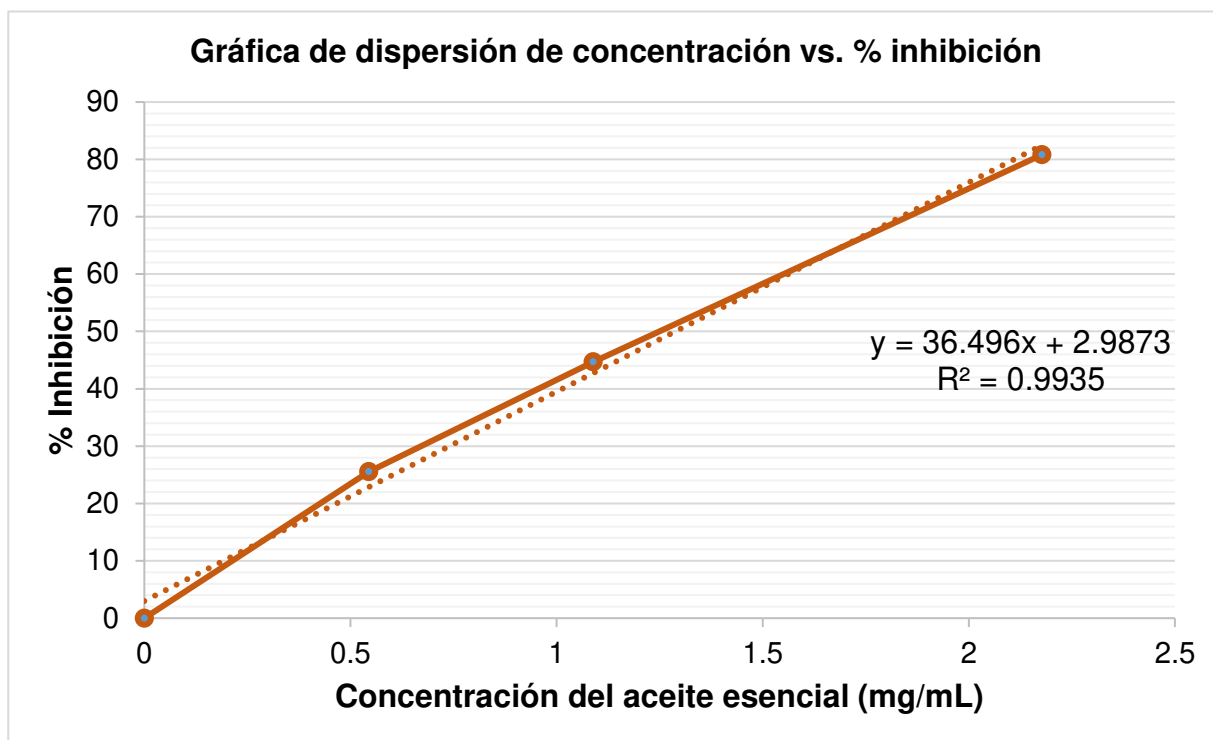


Figura 36. Curva de captación del radical ABTS^{•+} del aceite esencial de *P. caerulea* expresado en concentración con relación de su %inhibición o %actividad antioxidante.

La gráfica del porcentaje de inhibición de los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} del estándar Trolox[®] se muestra en el anexo N°6.

6.6. Actividad antimicrobiana de *P. caerulea*

Fue evaluado frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*, se realizó preliminarmente el método de difusión en agar y posteriormente, a los resultados que presentaron actividad significativa se le determinó la CMI.

6.6.1. Actividad antimicrobiana mediante método de difusión en agar

Los resultados del método de difusión en agar se expresaron mediante la medida de los halos de inhibición en mm (zonas claras de inhibición de crecimiento) en las tablas 16 y 17 para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Los resultados obtenidos por este método nos proporcionan resultados cualitativos al clasificar a los microorganismos como sensibles, intermedios o resistentes⁷³.

Tabla 16. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Persea caerulea* “junjulí” frente a *E. coli* ATCC 25922 empleando el método de difusión en agar.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (%)	Bacteria (halos de inhibición en mm)	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	
Aceite esencial de junjulí	100	Inactivo	Resistente (Baja)
	75	Inactivo	Resistente (Baja)
	50	Inactivo	Resistente (Baja)
	25	Inactivo	Resistente (Baja)
Control negativo	DMSO	Inactivo	Resistente (Baja)
Control Positivo	Amoxicilina	24.5	Sensible (Alta)

Tabla 17. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Persea caerulea* “junjulí” frente a *S. aureus* ATCC 25923 empleando el método de difusión en agar.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (%)	Bacteria (halos de inhibición en mm)	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
Aceite esencial de junjulí	100	20.5	Sensible (Alta)
	75	16.5	Intermedia (Moderada)
	50	15	Intermedia (Moderada)
	25	13	Resistente (Baja)
Control negativo	DMSO	Inactivo	Resistente (Baja)
Control positivo	Amoxicilina	36.5	Sensible (Alta)

La actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli* y *S. aureus* se evaluó mediante la formación de halos de inhibición, demostrando actividad antimicrobiana sensible (alta) del aceite esencial de junjulí a una concentración de 100%, y una actividad intermedia (moderada) a 50 y 75% frente a *S. aureus* ATCC 25923 (figura 38). Por la otra parte, no se evidenció una acción antimicrobiana significativa frente

a *E. coli*, ya que no se observó la presencia de un halo de inhibición del aceite esencial frente a *E. coli* (figura 37).

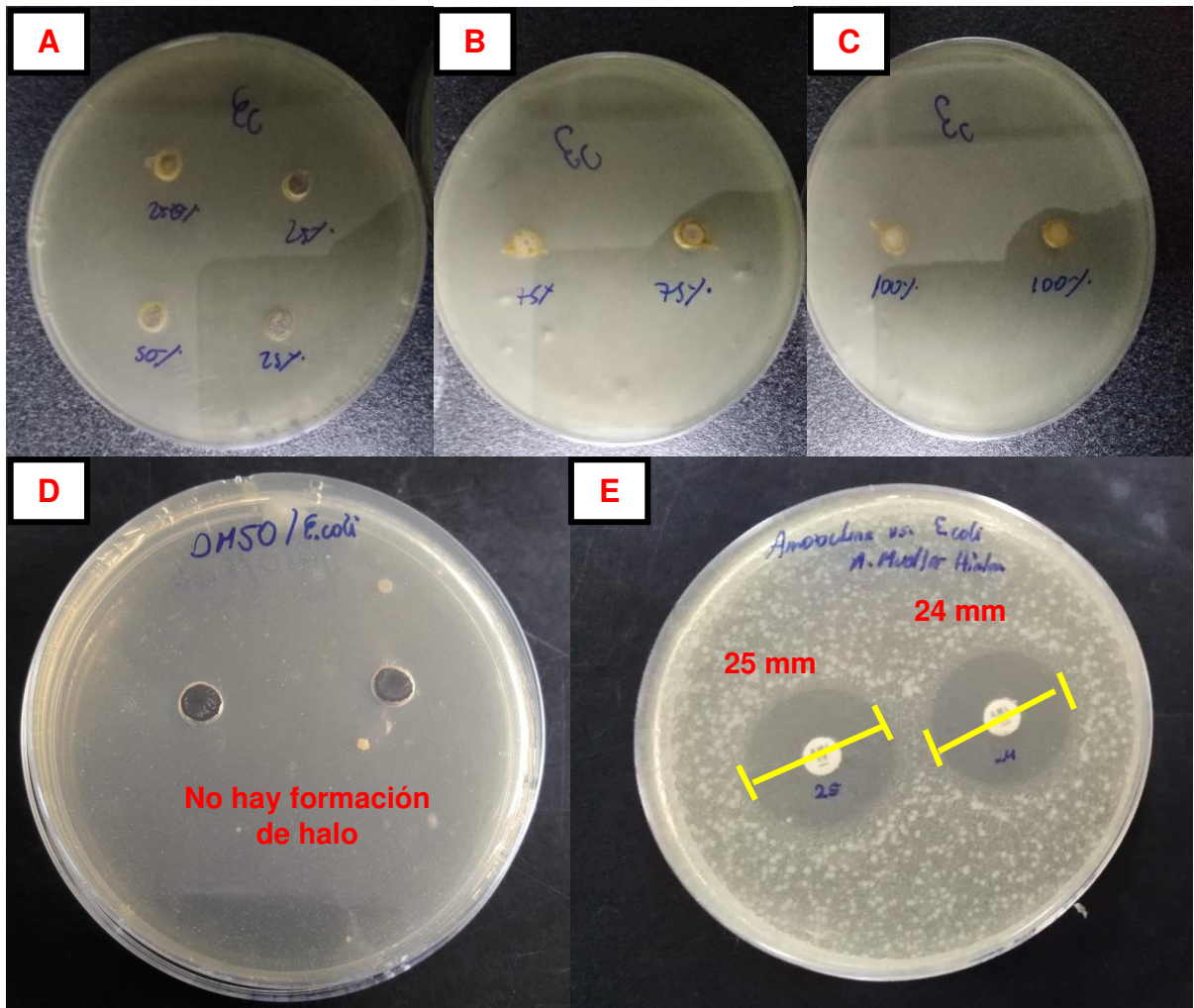


Figura 37. Actividad antimicrobiana mediante método de difusión en agar del aceite esencial de *P. caerulea* a diferentes porcentajes de concentraciones, contra *E. coli* ATCC 25922.

Donde:

- A: Aceite esencial al 25% y 50%
- B: Aceite esencial al 75%
- C: Aceite esencial al 100%
- D: Control negativo (DMSO)
- E: Control estándar de amoxicilina

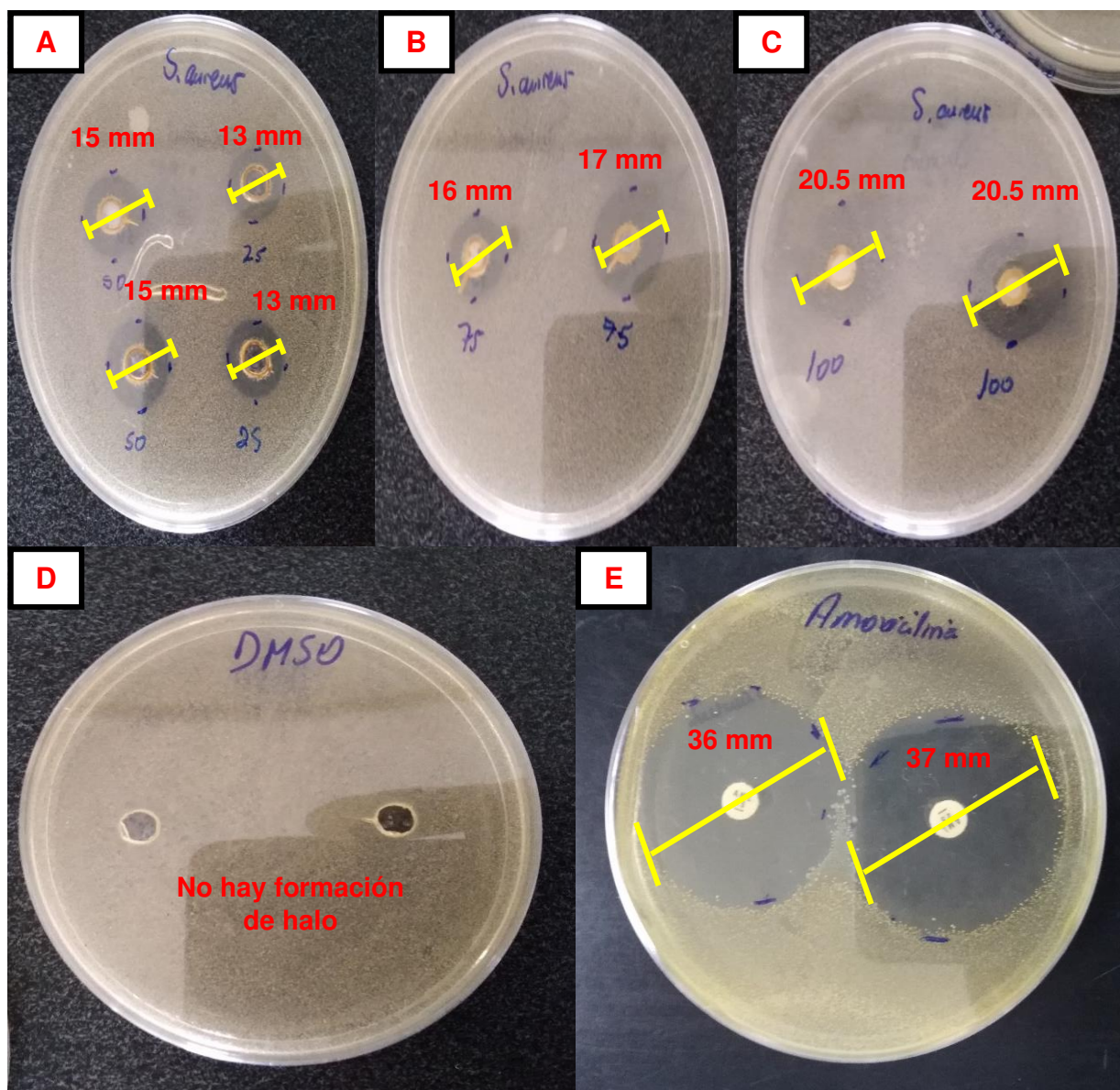


Figura 38. Actividad antimicrobiana mediante método de difusión en agar del aceite esencial de *P. caerulea* a diferentes porcentajes de concentraciones, contra *S. aureus* ATCC 25923.

Donde:

A: AE al 50% y 25%

B: AE al 75%

C: AE al 100%

D: Control negativo (DMSO)

E: Control estándar de amoxicilina

6.6.2. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Debido a que los resultados previos mostraron que el aceite esencial no presentaba actividad significativa sobre la cepa de *E. coli*; ya que no se observaron halos de inhibición, pero si actividad significativa del aceite esencial sobre *S. aureus*, se procedió a determinar la CMI mediante el método de microdilución colorimétrica solo para la cepa de *S. aureus*. Los resultados se expresan mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) en la tabla 18.

Los métodos de microdilución son los más apropiados para la determinación de los valores de CMI (concentración mínima inhibitoria), ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano probado en el medio de microdilución. El valor de CMI registrado se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado que inhibe el crecimiento visible del microorganismo analizado, y generalmente se expresa en $\mu\text{g} / \text{ml}$ o mg / L ⁷³.

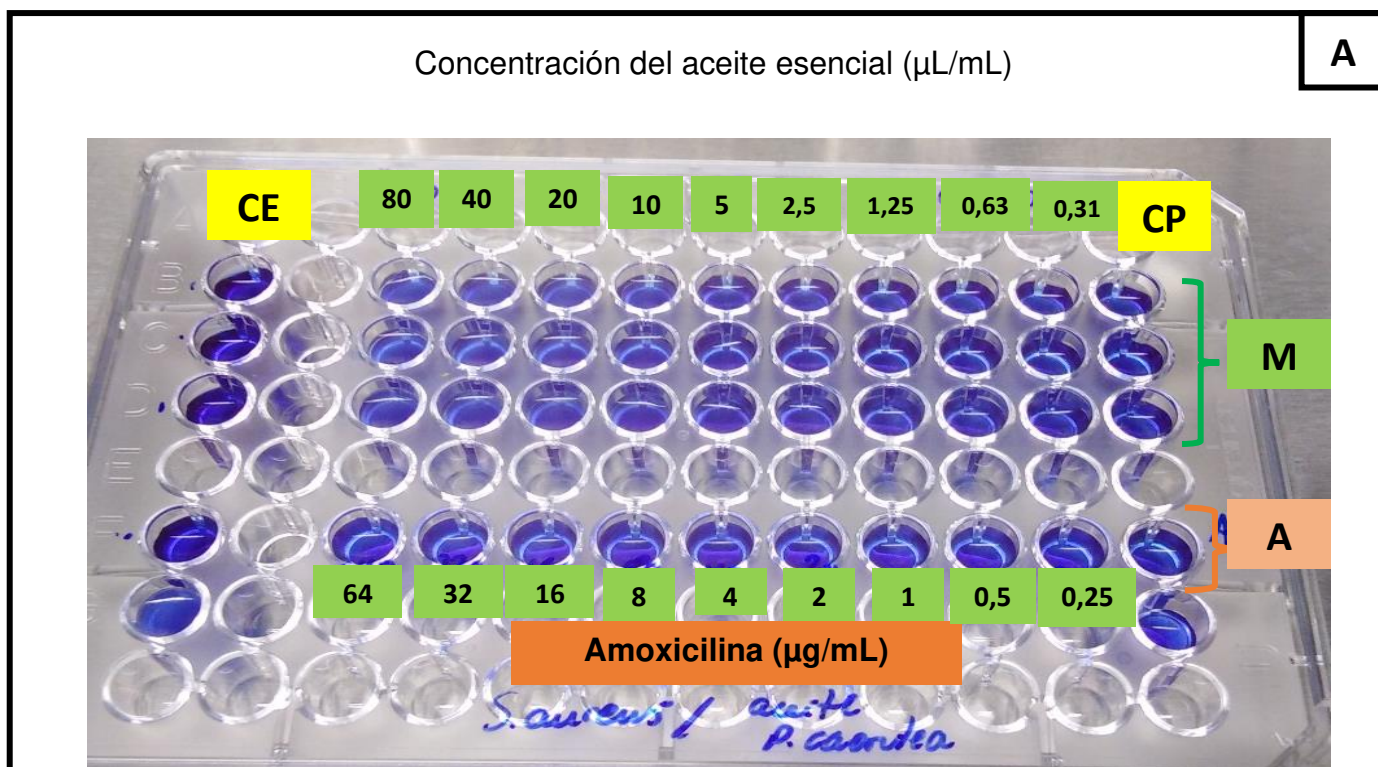
Tabla 18. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *P. caerulea*, expresado como concentración mínima inhibitoria (CMI).

Actividad inhibitoria frente a cepa de <i>S. aureus</i>	Muestra	
	<i>P. caerulea</i>	Amoxicilina ^a
CMI (mg/mL o $\mu\text{g}/\text{mL}$)	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (8,71 mg/mL)	0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

^a Estándar de referencia

La CMI del aceite esencial de junjúlí muestra que presente una actividad antimicrobiana débil comparado con el estándar de amoxicilina frente a cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Como se observa en la figura 39, fueron las concentraciones más bajas a la cual no hubo cambio de color las que se consideraron como los valores de las CMI respectivamente.



M: muestra aceite esencial, A: Amoxicilina, CE: control de esterilidad, CP: Control positivo

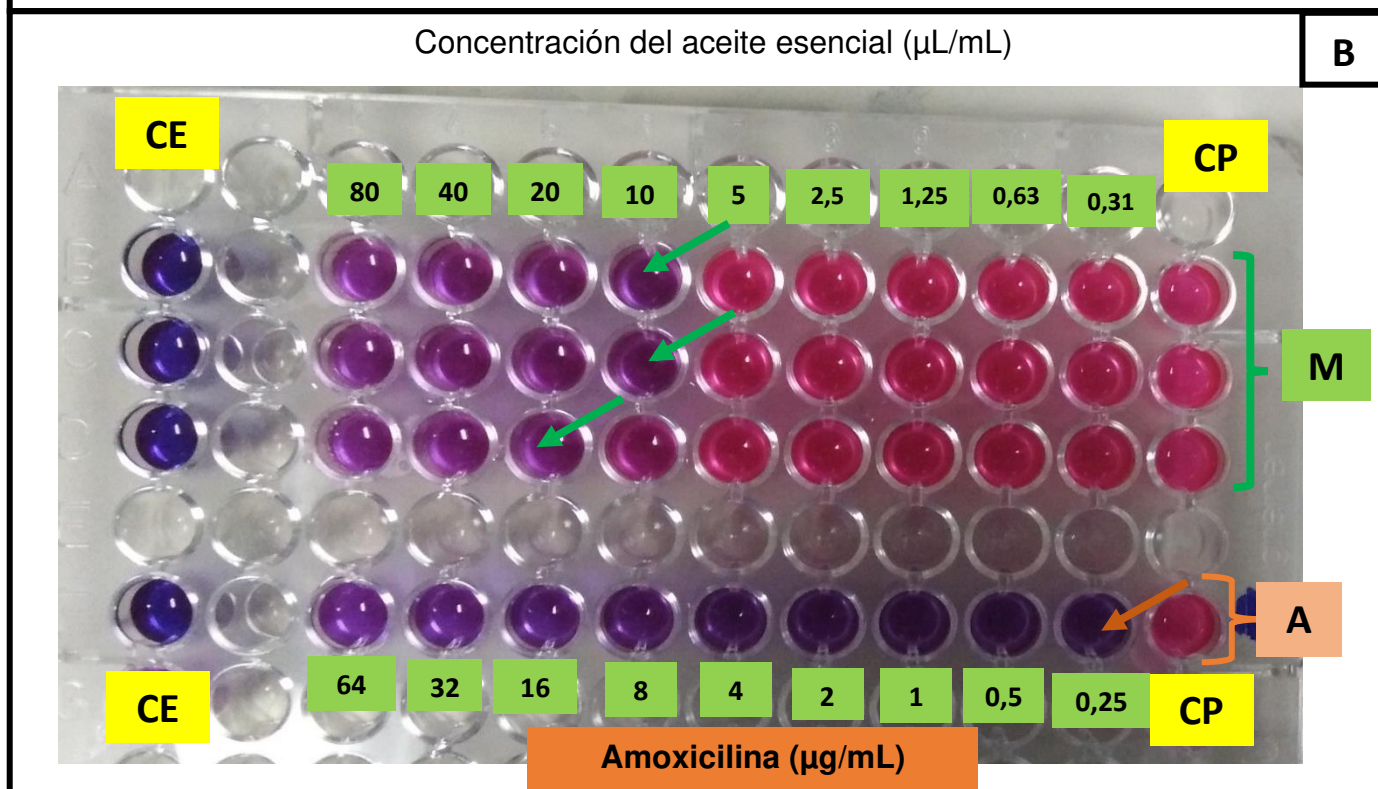


Figura 39. Determinación de la CMI del aceite esencial de *P. caerulea* y estándar de Amoxicilina por el método de microdilución colorimétrica contra cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Donde: A: Microplaca antes de incubar, B: Microplaca después de incubar.

6.7. Efecto fungistático de *P. caerulea*

El efecto fungistático se evaluó frente a la cepa de *C. albicans*, realizándose primero por el método de difusión en agar y si los resultados presentan actividad significativa se le determinó la CMI mediante el método de microdilución colorimétrica en microplaca.

6.7.1. Efecto fungistático mediante método de difusión en agar

Los resultados del método de difusión en agar se expresaron mediante la medida de los halos de inhibición en mm observados en la figura 40 y detallados en la tabla 19 para *C. albicans*; se clasificaron los resultados obtenidos como significativo cuando presenta un halo mayor a 18mm.

Tabla 19. Actividad fungistática del aceite esencial de *Persea caerulea* “junjulí” frente a *C. albicans* ATCC 10231 empleando el método de difusión en agar.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (%)	Bacteria (halos de inhibición en mm)	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
		<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
Aceite esencial de junjulí	100	21	Significativa
	75	19.5	Significativa
	50	16.5	No significativa
	25	10.5	No significativa
Control negativo	DMSO	Inactivo	-
Control positivo	Fluconazol	6	No significativo con disco de 25mcg

El efecto fungistático frente a la cepa de *C. albicans* se evaluó mediante la formación de halos de inhibición, demostrando así su efecto fungistático significativo, con una actividad antimicrobiana a una concentración de 100% y 75% (figura 40).

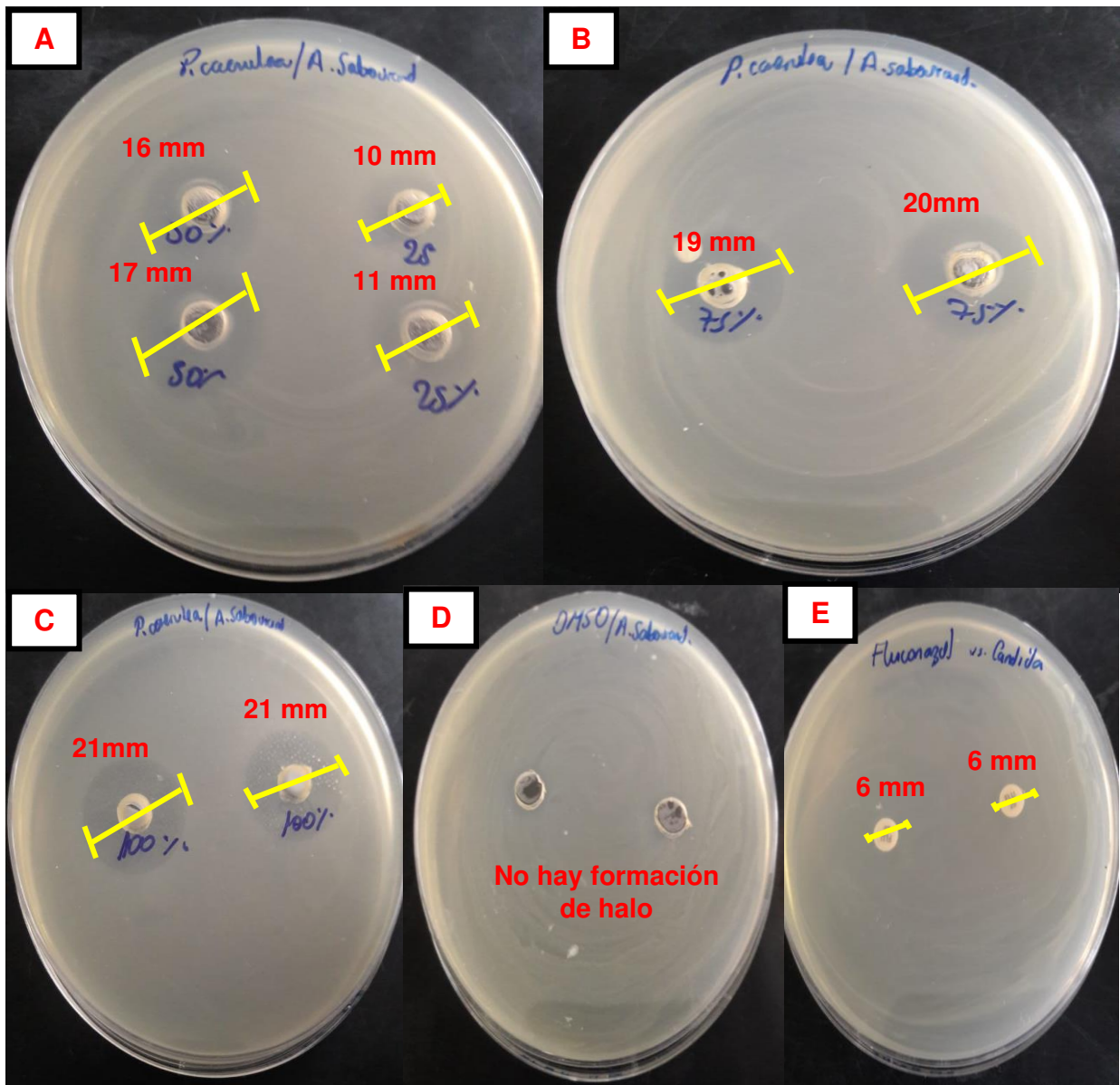


Figura 40. Efecto fungistático mediante método de difusión en agar del aceite esencial de *P. caerulea* a diferentes porcentajes de concentraciones, contra *C. albicans* ATCC 10231.

Donde:

- A: AE al 50% y 25%
- B: AE al 75%
- C: AE al 100%
- D: Control negativo (DMSO)
- E: Control estándar de fluconazol

6.7.2. Determinación de CMI por el Método de Microdilución colorimétrica en Microplaca

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) ya que en los resultados presentó previamente actividad significativa frente a *C. albicans*. Los resultados se expresan mediante CMI en la tabla 20.

Tabla 20. Efecto fungistático del aceite esencial de *P. caerulea*, expresado como concentración mínima inhibitoria (CMI).

Actividad inhibitoria frente a cepa de <i>C. albicans</i>	Muestra	
	<i>P. caerulea</i>	Fluconazol ^a
CMI (µL/mL o µg/mL)	40 µL/mL (34,84mg/mL)	64 µg/mL

^a Estándar de referencia

La CMI del aceite esencial de junjolí muestra que presente un efecto fungistático menor comparado con el estándar de fluconazol frente a la cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

Como se observa en la figura 41, fueron las concentraciones más bajas a la cual no hubo cambio de color las que se consideraron como los valores de las CMI respectivamente.

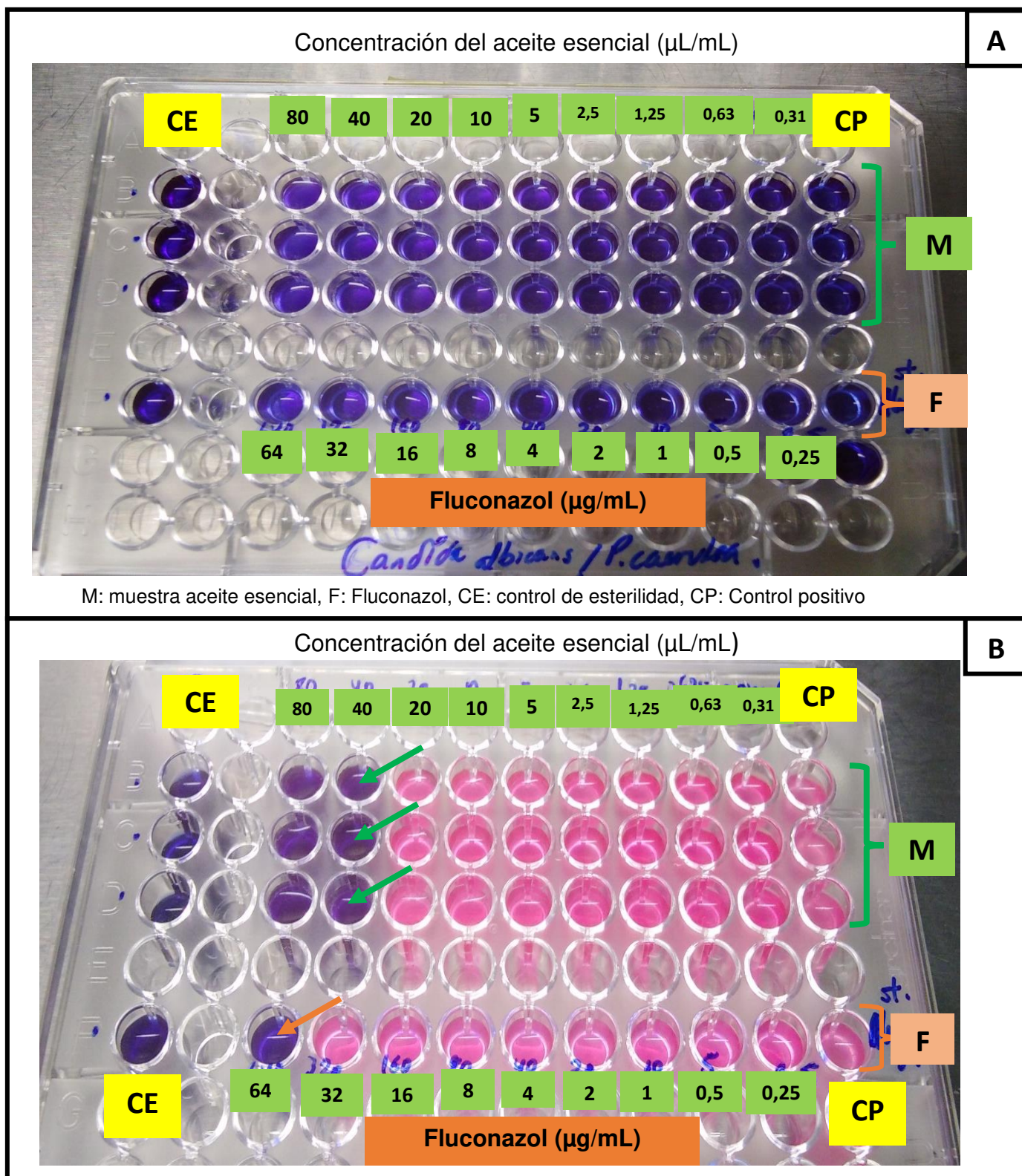


Figura 41. Determinación de la CMI del aceite esencial de *P. caerulea* y estándar de Fluconazol por el método de microdilución colorimétrica contra cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

Donde: A: Microplaca antes de incubar, B: Microplaca después de incubar.

7. DISCUSIÓN

Persea caerulea (Ruiz & Pav) Mez. es una especie que ha sido reportada desde Honduras hasta Bolivia, exceptuando Brasil; es considerada una especie pionera en los estratos arbóreos de la vegetación secundaria y puede encontrarse dentro de los bosques nublados y a lo largo de áreas intervenidas como carreteras y potreros¹⁹; dicha especie está ampliamente distribuida (500-2000 m) desde bosques de tierras bajas a bosques pre-montanos en Mesoamérica y Suramérica, principalmente en los países de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Sin embargo, sólo se reportan mayores estudios en Colombia y Venezuela^{19,20}, reportando actividades farmacológicas en nuestro país, no obstante, no se han encontrado investigaciones sobre la composición química, actividad antioxidante, antimicrobiana y efecto fungistático tanto en extractos como en el aceite esencial, siendo una pieza fundamental para la realización de este trabajo de investigación.

Los factores intrínsecos como la zona geográfica, forma de cultivo y el medio ambiente pueden afectar que varíen la composición química de los aceites esenciales de una misma especie vegetal. Así mismos factores como la edad fonológica de la planta, porcentaje de humedad del material cosechado, y el método de extracción ha sido identificado como posibles fuentes de variación para los componentes químicos, toxicidad y bioactividad de los extractos. Los AE son mezclas complejas que comprenden muchos compuestos individuales, cada uno de estos componentes contribuye a los efectos beneficiosos o adversos de estos aceites. Por lo tanto, el conocimiento sobre la composición del aceite esencial permite una mejor visión y enfoque al estudio; dicho conocimiento tan detallado solo se puede obtener mediante análisis de GC capilar cuidadosamente realizados⁸⁴.

En este trabajo de investigación se realiza la espectrometría de masas con cromatografía de gases con headspace estático (SHS-GC-MS) debido a que es potente y eficiente en la forma de perfilar la composición de componentes volátiles complejos debido a su efectividad en simultáneo de la separación cromatográfica e identificación estructural. En comparación con la inyección directa, el muestreo SHS es limpio y conveniente como técnica de extracción de gas para análisis GC-MS⁸⁵.

El rendimiento obtenido mediante la extracción por destilación por arrastre de vapor de agua para el aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez fue de 0.095% v/p de hojas, dicho valor está conforme con lo que se reporta en la literatura: <0.1% v/p⁸⁶, indicando así que el método de extracción fue la adecuada. En general, las especies de *Persea* fueron las que presentaron el menor rendimiento en aceites esenciales estudiados de la familia Lauraceae, así mismo las especie de *Persea caerulea* presentan compuestos mayoritarios diferentes a los encontrados en los aceites esenciales de los otros géneros examinados de la familia Lauraceae⁸⁶. Los componentes del aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “junjulí” identificado mediante CG/EM mediante dos metodologías donde se lograron identificar 31 componentes mediante el análisis por Inyección Headspace; siendo cinco componentes los principales: alfa-pineno (37,36%), beta-pineno (24,14%), alfa felandreno (14,22%), o-Cimeno (4,74%), beta-Mirceno (3,87%) y D-Limoneno (3,82%), de los cuales representan el 88,15% del contenido total ; y 90 componentes mediante el análisis por Inyección líquida; siendo ocho componentes principales: alfa-pineno (15,73%), alfa felandreno (11,71%), beta-pineno (10,78%), Cariofileno (6,66%), (E)-beta-Farneseno (5,85%), o-Cimeno (4,73%), D-Limoneno (3,56%) y beta-felandreno (2,83%); los cuales representan el 61,85% del contenido total.

Los aceites esenciales presentan diferentes compuestos químicos, los compuestos activos más importantes se incluyen en 2 grupos químicos: terpenoides (monoterpenoides y sesquiterpenoides) y fenilpropanoides, estos grupos provienen del metabolismo primario sintetizado por diferentes vías metabólicas como son: Vía del ácido shikímico, donde son sintetizados los fenilpropanoides, y vía del ácido mevalónico, donde se sintetizan los terpenoides⁸⁷. Los terpenos son clasificados de acuerdo con el número de unidades isoprenos en su estructura; como hemiterpenos (una unidad), monoterpenos (dos unidades), sesquiterpenos (tres unidades), entre otros. La mayoría son mezclas altamente complejas de monoterpenos y sesquiterpenos²³. En cambio, los fenilpropanoides, provienen de un grupo fenilo aromático (seis carbonos) con una terminación de propeno (tres carbonos); entre ellos tenemos: metileugenol, anetol, eugenol, cinamaldehído, entre otros⁸⁸.

En cuanto a sus propiedades biológicas, se tiene en cuenta que los aceites esenciales son mezclas complejas de numerosas moléculas y se caracterizan por tener dos o tres principales componentes en concentraciones elevadas (20–70%) frente a las cantidades trazas de otros componentes; por lo que existe la duda de conocer si los efectos biológicos son resultado de una sinergia del total o solo los de las principales moléculas presentes en mayor proporción. En la literatura en la mayoría de los casos, solo los componentes principales de ciertos AE como terpinol, eugenol, timol, carvona, geraniol, linalool, carvacrol, citronelol, nerol, safrol, eucaliptol, limoneno, cinamaldehído; determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales²⁵.

Los estudios realizados en Colombia, departamento de Antioquía, municipio de Santa Bárbara, sobre la composición del AE de *P. caerulea* determina que presenta en su composición monoterpenos (1.58%), sesquiterpenos (54.72%), sesquiterpenoides (36.4%) y derivados de ácidos grasos (5.60%); siendo el componente mayoritario el Cariofileno (25.22%)⁸⁶. Mientras que la caracterización química del aceite esencial de *P. caerulea* de Colombia, en el departamento de Magdalena, determinó a 55 componentes en el aceite esencial, donde los componentes mayoritarios fueron: los sesquiterpenos: β -farneseno (38.90%), β -cariofileno (35.64%), espatulenol (28.35%) y el monoterpeno: sabineno (23.13%)²⁰. El principal componente en la composición del aceite esencial de *P. caerulea* de Costa Rica fue el β -cariofileno (35.4%) presentando en su composición sesquiterpenos (83.3%), monoterpenos (1.6%), monoterpenoides oxigenados (1.8%), sesquiterpenoides oxigenados (5.6%) y derivados de ácidos grasos (7.7%)⁸⁹. La composición de los aceites esenciales se diferenció no solo por lugar sino por periodo de colecta; donde los compuestos sabineno y β -cariofileno marcaron la diferencia entre los lugares y periodo de colecta²⁰. El producto de extracción puede variar en calidad, cantidad y composición según el clima, composición del suelo, órgano vegetal, edad y etapa de vegetación del ciclo²⁵. Así mismo la influencia de variables genéticas y no genéticas que involucran condiciones edáficas y climáticas en la calidad y cantidad de aceites volátiles es inevitable. La fitoquímica de la planta puede estar influenciada por la estación e incluso las horas y cantidad de luz solar, debido a este hecho es que algunos

componentes pueden acumularse en una duración específica para responder a los cambios ecológicos⁴⁹.

Los reportes de dichos estudios previos presentan ciertas diferencias tanto cualitativas como cuantitativas con respecto a esta investigación realizada, ya que se identifica variación en el porcentaje de monoterpenos y de compuestos mayoritarios en este estudio, presentando en esta investigación como compuesto mayoritario a los monoterpenos: alfa-pineno y beta-pineno.

Resulta importante conocer la estructura química de los componentes del AE de las hojas, ya que en reportes hallados menciona que diferencias en su estructura química, ya sea por el número de esqueletos cíclicos y presencia de grupos biológicos hace que varíe los efectos biológicos de los monoterpenos mono y bicíclicos como en el caso del limoneno y (-) alfa-pineno respectivamente. La presencia de al menos un grupo hidroxilo en monoterpenos afecta a sus actividades anticancerígena y quimiopreventivas siendo mucho más fuertes que la ausencia de tal grupo⁹⁰.

Hasta el momento no existen reportes sobre la composición química del aceite esencial de *P. caerulea* en las diversas regiones del Perú, sólo se reportan estudios de otra especie del género *Persea*, como lo es *Persea americana* Mill. de la región de la Libertad, mencionando que la pulpa del fruto presenta sesquiterpenos, hidroxitriptamina, vitaminas A y E, lípidos, proteínas, carotenoides y los carbohidratos: glucosa, fructosa, perseitol y mannoheptulosa⁹¹. Y de la región de Junín, el aceite de aguacate es rico en vitaminas (A, B, C y E); y está compuesto por ácido palmítico (7%), esteárico (1%), oleico (79%) y linolénico (13%); mientras que el aceite de semilla está compuesto por ácido palmítico (20,96%), ácido oleico (18,10%), ácido linolénico (12,17%) y ácido linoleico (48,77%)⁹².

En un estudio realizado, los efectos eliminadores de R-radicales de γ -terpineno (84.7%), terpinoleno (87.4%) y el geraniol (87.7%) tienen un efecto de eliminación de radicales 3.5 veces más fuerte que el de Trolox ($p < 0,05$)⁹³. De estos componentes que hace referencia el autor sólo está presente en el AE de junjúl de este estudio; el γ -terpineno (0.56%), a lo cual se podría atribuir la baja capacidad

antioxidante por encontrarse moléculas con capacidad antiradicalaria en un pequeño porcentaje.

Así mismo se menciona que los efectos eliminadores de R-radicales de linalol, y α -pineno fueron más altos que los de mirceno, β -pineno, terpinen-4-ol y *d*-limoneno⁹³. De lo mencionado en el aceite esencial de junjúlí se encuentran dichos metabolitos: α -pineno (37.36%), Linalol (0.31%), mirceno (3.87%), β -pineno (24.14%), terpinen-4-ol (0.04%) y *d*-limoneno (3.82%).

En otro estudio, donde se investigaron componentes mayoritarios y la relación de dichos componentes con la propiedad antioxidante del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, se determinó la presencia del monoterpeno como la pulegona y el sesquiterpeno Germacreno-D, en este estudio se mostró una poca capacidad antioxidante del aceite esencial de la muña; esto podría atribuirse a sus componentes mayoritarios; entre ellos el germacreno-D⁹⁴. De dichas moléculas, el germacreno-D (2.67%) se encuentra en el aceite esencial de junjúlí.

La proporción de moléculas ionizadas del antioxidante (ejemplo, el grupo fenolato) implica que, aparte de la estructura de la molécula antioxidante, el tipo de solvente y el pH de la solución de ensayo en particular tienen una gran influencia en la reactividad de los antioxidantes⁹⁵. Así por ejemplo tenemos que las reacciones DPPH son altamente sensibles al entorno de reacción, como tipo y cantidad de solvente, pH, oxígeno, exposición a la luz, iones metálicos y frescura del reactivo DPPH^{6,66}. Por lo tanto, autores han propuesto modificaciones al ensayo en un intento de minimizar los problemas antes mencionados y simplificar y automatizar aún más el método⁶, por lo que se investigó el uso del agente seco DPPH evaporado bajo nitrógeno en una microplaca de 96 pocillos produciendo una placa de matriz de reactivos secos DPPH (20-50 μ g por pocillo), para ello se preparó una solución madre de 1 mg de DPPH en 1 ml de metanol y se añadió (20-50 μ l) a cada uno de los pocillos. Para encontrar la mejor concentración de DPPH seco a utilizar, se añadió Trolox en diferentes concentraciones. La absorbancia de DPPH fresco (30 μ g en 0,3 mL de metanol) y la matriz de reactivos secos de DPPH (30 μ g por pocillo disuelto en 0,3 mL de metanol) se compararon a 517 nm⁹⁶. Este método modificado fue validado y mostró una excelente sensibilidad, siendo más conveniente y simple de operar con un mínimo solvente requerido⁶.

La presencia de tanto los mecanismos de transferencia de electrones como de átomos de hidrógeno son particularmente evidente en la variabilidad de las reacciones DPPH con solvente metanol, el solvente más comúnmente utilizado para el ensayo DPPH, se une fuertemente a los átomos de hidrógeno e inhibe los procesos HAT (transferencia de átomos de hidrógeno). La absorbancia de DPPH• en metanol y acetona es menor que con otros solventes⁶⁶.

Por todo lo mencionado y teniendo los resultados de la actividad antioxidante del aceite esencial de junjúlí tal como se presenta en las tablas 14 y 15 , donde se determina que presenta una baja capacidad antioxidante tanto por el método de DPPH y ABTS, ya que a pesar de tener en su composición metabolitos como: γ -terpineno, linalol, α -pineno, mirceno, β -pineno, terpinen-4-ol y *d*-limoneno; a los cuales se les atribuye buena capacidad antioxidante⁹³, presenta también el metabolito germacreno-D a la que se le atribuyó baja capacidad antioxidante⁹⁴; por lo tanto la baja actividad antioxidante del aceite esencial de *Persea caerulea* se le atribuye a sus metabolitos de su composición y a las interacciones sinérgicas y antagónicas que pueden existir entre ellos.

En un estudio realizado sobre análisis de los componentes principales de *Schinus molle* L., se identifica como componentes mayoritarios a los sesquiterpenos oxigenados, y como componentes minoritarios a los hidrocarburos y monoterpenos oxigenados ; indicando que la alta proporción de sesquiterpenos oxigenados promueven la actividad antioxidante de los aceites esenciales contra el radical ABTS, mientras que la actividad antioxidante contra el radical DPPH requiere la combinación de las diferentes familias químicas contenidas en el aceite esencial de *Schinus molle* L.⁹⁷. Mencionando esto, en nuestro estudio realizado sobre la composición química del aceite esencial de junjúlí, se determinó como componentes mayoritarios a los monoterpenos; y como componentes minoritarios a los sesquiterpenos oxigenados; por lo cual se podría atribuir también una baja capacidad antioxidante del aceite esencial a comparación de los resultados que se obtuvieron del aceite esencial de *Schinus molle* L.

En relación con su propiedad antioxidante del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* “junjúlí”, se evaluó mediante dos métodos de captación de radicales:

captación de radical DPPH• y captación de radical ABTS•+. Con respecto al método de captación de radical DPPH, el AE de junjúlí presenta un valor IC₅₀ de 10613,965 µg/mL y el estándar Trolox® presentó un IC₅₀ de 2,504 µg/mL; mientras que con el método de captación de radical ABTS•+ tiene un IC₅₀ de 1288,415 µg/mL y el Trolox® presenta un IC₅₀ de 3,053 µg/mL; mostrando en ambos casos la baja actividad antioxidante a comparación de los valores IC₅₀ del estándar Trolox®, además se puede observar valores de actividad antioxidante variable teniendo mejores resultados en el ensayo de captación de radicales ABTS•+. En el artículo de investigación de Granados C, Yáñez X, Acevedo D., se menciona que debido a la complejidad química que presentan los AE, los resultados obtenidos pueden ser diferentes dependiendo del ensayo empleado en la prueba de actividad antioxidante. Por lo cual, se recomienda realizar múltiples ensayos y métodos que puedan ser útiles para hallar la actividad de ambas especies (hidrofílica y lipofílica) y permitir así una mejor comparación de los resultados⁹⁸.

Los métodos más aplicados son ABTS•+ y DPPH• ya que se ha demostrado que ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El ABTS•+ es uno de los ensayos más rápidos, reproducibles, mostrando varios picos máximos de absorbancia (414, 654, 754 y 815 nm) y además de presentar buena solubilidad lo que permite el ensayo de compuestos hidrofílicos como lipofílicos; mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (sistemas hidrofóbicos) y sólo presenta un pico de absorbancia a 515 nm. Esto podría explicar porque existieron diferencias entre los valores obtenidos, teniendo mejor capacidad antioxidante por el ensayo ABTS•+ con respecto a los valores del ensayo DPPH•⁹⁹. Así también en relación al valor de las unidades TEAC obtenidas, que es la comparación por equivalencias o capacidad antioxidante equivalente al Trolox, se expresan en µg Trolox/mg muestra, el resultado de valor de TEAC obtenido empleando el método de ABTS•+ (2,370 µg de Trolox / mg) fue mayor comparado con el resultado obtenido del método de DPPH (0,236 µg de Trolox / mg), lo cual se observa que el aceite esencial posee mejor actividad antioxidante como captador de radicales ABTS•+.

En este trabajo de investigación se probó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *P. caerulea* frente a las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, en un

primer lugar por el método de difusión en agar, debido a que se tiene muchas ventajas frente a otros métodos como son bajo costo, simplicidad, capacidad de probar enormes cantidades de microorganismos y agentes antimicrobianos, y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados ya que permite descartar en un primer momento los microorganismos con los que no se presenten ninguna actividad frente a los agentes antimicrobianos a probar. Sin embargo, no permite estimar la concentración del agente antimicrobiano probado, por lo cual, los métodos de dilución en esos casos serán los más apropiados para determinar el valor de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) ⁷³.

En los resultados obtenidos se observa que, en el método de difusión en agar, cuando se empleó el disco de fluconazol (25mcg/disco) frente a la cepa de *C. albicans* no hubo la formación de un halo significativo, sin embargo cuando se realizó la prueba de microdilución colorimétrica si hubo una concentración mínima inhibitoria al preparar la solución del estándar de fluconazol a la concentración de 64 µg/mL, esto explica por qué no se observó un halo de inhibición significativo con el estándar del disco de fluconazol.

En cuanto a la acción antimicrobiana, del género *Persea*, el AE de las especies *P. duthiei*, *P. odoratissima* y *P. gamblei* han exhibido actividad antibacteriana frente a diversas bacterias Gram positiva y Gram negativa, descubriendo así que el aceite esencial de *P. duthiei* era efectivo contra *E. coli*; *P. gamblei* mostró el valor CMI más bajo contra *S. aureus* mientras que el AE de *P. odoratissima* era activo contra *E. coli* (3,90 µl / ml cada uno). Dicha actividad que presentan está relacionada directamente con su composición química así tenemos que los componentes mayoritarios de *P. odoratissima* presenta los componentes mayoritarios alfa-Pineno (16.6%), sabineno (13.1%), beta-cariofileno (10.4%)¹⁰⁰; y adicionalmente en otro estudio se reporta que la alta actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Juniperus communis* L es dada por el alto contenido y combinación de alfa-pineno y sabineno²⁸ como ocurre en el caso del aceite esencial de *P. odoratissima* y su buena actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, a diferencia de nuestra investigación realizada de *P. caerulea* donde se muestra inactivo frente a *E. coli* por no presentar entre sus componentes principales al sabineno.

Los pinenos existen como isómeros ópticos o enantiómeros, estos compuestos pueden exhibir diferencias en toxicidad y actividad biológica. En las plantas, los pinenos (alfa y beta) muestran actividad fungicida y en su actividad biológica está incluido el uso como insecticida natural. Los enantiómeros negativos exhiben efectos antivirales contra el virus de la bronquitis infecciosa, y en cuanto a su actividad antimicrobiana no hay un consenso debido a que en algunos estudios atribuyen el compuesto pineno a su actividad antimicrobiana, como otros indican que los pinenos no exhiben dicha actividad; por lo tanto, es necesario conocer e identificar los enantiómeros presentes en el compuesto. La prueba de difusión de agar mostró que solo los enantiómeros positivos de los isómeros alfa pineno y β -pineno fueron activos, dando además valores de CMI que oscilan entre 17 y 4.150 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Se mostraron que (+) - α -pineno y (+) - β -pineno eran altamente tóxicos a *Candida albicans*, matando el 100% del inóculo en 60 min y se evitó así mismo la formación de biopelículas de *C. albicans*. Así mismo, el efecto bactericida ocurrió después de 6 h frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Sin embargo, no se detectó actividad antimicrobiana con los enantiómeros negativos hasta 20 mg / mL¹⁰¹.

En un estudio realizado en Corea sobre el (-)- α -pineno muestra efectos ansiolíticos e hipnóticos administrado por inhalación. Además, varios estudios han atribuido propiedades biológicas al (-)- α -pineno, incluyendo efectos antimicrobianos, hipertensos, anti-nociceptivo y antiinflamatorio¹⁰². En otro estudio realizado α -pineno presenta una fuerte repelencia, toxicidad de contacto y actividad de fumigación contra microorganismos adultos *Tribolium confusum*. Sin embargo, las tasas de inhibición contra hongos son moderadas¹⁰³.

Es importante recalcar que las levaduras y hongos están marcadamente inhibidos por aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos, aldehídos y alcoholes¹⁰⁴. Los monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos son los principales grupos de terpenos que se encuentran en las especies y hierbas que tienen actividades biológicas notables como los efectos antimicrobianos en diferentes patógenos como especies de *Candida*. Así mismo se tiene que las fracciones que tienen más alcohol de cadena larga y aldehídos fueron más activas contra bacterias gram positivas. En un estudio realizado se determinó que el timol tenía una actividad antibacteriana

más fuerte que el fenol. En general, en la mayoría de los casos, las bacterias grampositivas son más susceptibles a compuestos antimicrobianos como los aceites esenciales, a comparación de las bacterias gramnegativas; esto puede estar relacionadas con la falta de membrana externa en organismos grampositivos⁴⁹, ya que algunos autores afirman que la membrana externa de las bacterias gram negativas tienen superficies de naturaleza altamente hidrofílica, y los extremos lipofílicos de la membrana celular de bacterias gram positivas facilitarían la penetración del aceite esencial por ser un compuesto hidrófobo⁵⁵. Esto podría explicar porque en la prueba de difusión en agar realizada en esta investigación, el aceite esencial de junjúlí enfrentado a la bacteria de *E. coli* (bacteria gram negativa) no mostró ninguna actividad significativa ya que no hubo formación de ningún halo de inhibición en las pruebas preliminares, a diferencia del halo formado frente a *S. aureus* (bacteria gram positiva).

Esta falta de actividad frente a *E. coli* puede deberse a que está comprobado científicamente que el uso de una mezcla de componentes antimicrobianos podría no mejorar la influencia o incluso reducir la acción inhibitoria de los aceites esenciales dependiendo del tipo de antimicrobiano y condiciones ambientales. Podría darse entonces el efecto sinérgico (efecto combinado es igual a la suma de los efectos de cada componente) o por el contrario el efecto de antagonismo (mezcla de antimicrobianos tiene menos efecto inhibitorio que cuando se usa individualmente)⁴⁹.

En la determinación de la CMI de la muestra frente a la cepa de *S. aureus* y *C. albicans* fueron 8,71 mg/mL y 34,84 mg/mL respectivamente, revelando una actividad antimicrobiana débil comparada con sus estándares; sin embargo, es importante mencionar que el método de microdilución colorimétrica con indicador resazurina fue el método óptimo empleado demostrando ser una de las mejores alternativas como mejor indicador redox para viabilidad celular, ya que el ensayo de resazurina en sí mismo es un método simple y rápido. La solución de resazurina se agrega a las células en un volumen correspondiente al 10% del medio (sin reemplazar el medio), y luego se puede medir la conversión a resorufina ya sea por colorimetría o fluorimetría⁸⁰. Éste indicador es más sensible que el ensayo donde se emplea el colorante MTT, también empleado para cuantificar viabilidad celular;

esto se debe a que la resazurina no interfiere con las reacciones de la cadena de transporte de electrones, ya que el punto medio del potencial redox de la resazurina es mayor que el de cualquiera de los componentes de la cadena de transporte de electrones, mientras que los indicadores con un potencial redox inferior como MTT no puede detectar la reducción mediada por citocromos⁷⁸.

Por todo lo recopilado respecto a estudios del aceite esencial de *P. caerulea* o del género *Persea*, y la información obtenida al realizar su identificación de componentes químicos, evaluar la actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y efecto fungistático; sólo marca el inicio y la base para realizar futuras investigaciones, ya que no se reportaron estudios de esa índole en nuestro país y pocos estudios a nivel de Latinoamérica. Todo ello con el fin de aislar y beneficiarse de compuestos con actividad biológica demostrada en otros estudios, se requiere entonces realizar más investigaciones para poder encontrar otras propiedades farmacológicas asociadas a dicha planta.

8. CONCLUSIONES

1. Los componentes del aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “junjulí” identificado mediante CG/EM mediante dos metodologías; se lograron identificar 31 componentes mediante el análisis por Inyección Headspace; siendo cinco componentes los principales: alfa-pineno (37,36%), beta-pineno (24,14%), alfa felandreno (14,22%), o-Cimeno (4,74%), beta-Mirceno (3,87%) y D-Limoneno (3,82%); y se obtuvieron 90 componentes mediante el análisis por Inyección líquida; siendo ocho componentes principales: alfa-pineno (15,73%), alfa- felandreno (11,71%), beta-pineno (10,78%), Cariofileno (6,66%), (E)-beta-Farneseno (5,85%), o-Cimeno (4,73%), D-Limoneno (3,56%) y beta-felandreno (2,83%). Teniendo por ambos métodos tres componentes de la familia terpenos(monoterpenos) que fueron comunes y mayoritarios por ambos métodos: alfa-pineno, beta-pineno y alfa-felandreno.
2. El aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “Junjulí” mostró una baja actividad antioxidante como captador de los radicales DPPH• y ABTS^{•+}, siendo mejor como captador de radical ABTS^{•+} que de radical DPPH•, por ser un componente lipofílico.
3. El aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “junjulí” presentó nula actividad antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC 25922 y baja actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 25923 con un CMI de 8,71 mg/mL.
4. El aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez “junjulí” mostró bajo efecto fungistático frente a *Candida albicans* ATCC 10231 con un CMI de 34,84 mg/mL.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la identificación de los componentes bioactivos del aceite esencial de *Persea caerulea* con el fin de atribuir sus propiedades farmacológicas a dichos componentes y de poder definir potenciales biológicos efectivos de acuerdo a la familia que pertenece los componentes. Dichos conocimientos mejorarían el desarrollo de futuros fármacos de origen natural.
- Debido a que éste trabajo de investigación identificó sólo los componentes presentes en el aceite esencial de las hojas, se recomienda identificar y aislar los metabolitos activos de un extracto hidroalcohólico de hojas de *Persea caerulea*, pudiendo quizás presentar mejor grado de actividad terapéutica.
- Realizar estudios posteriores de otros efectos farmacológicos atribuibles de acuerdo a sus componentes identificados, como, por ejemplo, actividad antiinflamatoria en el modelo animales, para demostrarse in vivo; así mismo determinar la toxicidad mediante bioensayos.
- Realizar futuros trabajos de investigación similares, a base de recursos naturales poco estudiados en las diferentes regiones de nuestro país, para afianzar la búsqueda de nuevos compuestos con buena actividad antioxidante, antimicrobianos en general y antifúngicos en particular.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bandoni AL. “Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica”. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata – Argentina. 2002; 27-34,180-242.
2. Martínez J, Sulbarán de Ferrer B, et. al. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2003; 20: 502-512.
3. León G, Osorio MR, Torrenegra, ME, González J. Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* L. Revista Cubana de Farmacia. 2015; 49(4):708-718.
4. Torrenegra AM. Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial foliar extraído de especies de orégano (*Origanum Vulgare*), orégano “Borde Blanco” (*Origanum Vulgare* Ssp) y Oreganito (*Lippia Alba* Mill) cultivado en la zona norte del Departamento de Bolívar (Colombia). [Tesis de magister]. Bolívar: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia; 2014.
5. Hossein P, Khaleghi M, Gorji A. Lavender and the Nervous System. Hindawi. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 1-10. DOI: 10.1155/2013/681304.
6. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. Journal of Functional Foods. 2015; 18 (Pt B): 757-781. DOI: 10.1016/j.jff.2015.01.047.
7. Sarkar A, Ghosh U. Natural Antioxidants - The Key to Safe and Sustainable Life. International Journal of Latest Trends in Engineering and Technology (IJLTET). 2016; 6(3): 460-466.
8. Rincón AC. Actividad Biológica de la Familia Lauraceae. [Tesis de magister]. Bogotá D.C: Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia; 2014.
9. Brack A, Heinz P. Perú Maravilloso. Lima: Edit. Epenza. Empresa Periodística Nacional SAC, 2002.
10. Reyes F, Palou E, López A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. UDLAP. 2014; 8(1):68-78.

11. Martín VM, Torres GJ, Varó VI. Evaluación de la toxicidad de metilparabeno en *Artemia franciscana*: efectos sobre crecimiento, supervivencia y biomarcadores. Nereis, Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación. 2015 Set 2; 8(1): 103-118.
12. Rodríguez EN. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai, Universidad Autónoma Indígena de México [En línea]. 2011 ene-Abr [Fecha de acceso 11 de octubre del 2018]; 7(1): 153-170. Disponible en: <http://revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/viewFile/26675/24991>.
13. OMS. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health 2001; 10(4): 284-294.
14. Reta A., Bitew A., Mengist, A. Bacterial Infections and Their Antibiotic Resistance Pattern in Ethiopia: A Systematic Review. Hindawi Advances in Preventive Medicine. 2019; 1–10. DOI:10.1155/2019/4380309.
15. Ávila L., Baquero E., Viña A, Murrillo E. Actividad antibacteriana de *Displostephium tolimense Cuatrec* (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. Vitae. 2006; 3(1): 55-60.
16. Gómez M, Toro J. Manejo de las semillas y la propagación de doce especies arbóreas nativas de importancia económica y ecológica [en línea]. Medellín: Corantioquia, 2009. 71 p. (Boletín Técnico Biodiversidad; No. 4). ISSN 2011-4087 [fecha de acceso 13 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.corantioquia.gov.co/SiteAssets/Lists/Administrar%20Contenidos/EditForm/boletin semillas especies forestales.pdf>
17. Missouri Botanical Garden. Tropicos.org. [Internet]. Saint Louis: Missouri Botanical Garden. 2020 – [acceso 21 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/17800002>
18. Grupo de Investigación Sostenibilidad, Infraestructura y Territorio -SITE. catalogofloravalleaburra.eia.edu.co/ [Internet]. Valle de Aburrá: Universidad EIA. 2014 – [acceso 21 de enero de 2020]. Disponible en: <https://catalogofloravalleaburra.eia.edu.co/species/49>
19. Hernán FP. Aportes al conocimiento taxonómico del género *Persea* (Lauraceae) en Venezuela [En línea]. Hoehnea. 2012 [Fecha de acceso 26

de septiembre del 2018]; 39(3): 435-478. Disponible en:
<http://www.scielo.br/pdf/hoehnea/v39n3/a07v39n3.pdf>

20. Álvarez JC. Estudio Químico Comparativo de Metabolitos Fijos y Aceite Esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez y evaluación de su actividad Biológica [Tesis doctoral]. Bogotá: Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Colombia; 2016.
21. Álvarez J, Cuca L, Carrasco A, Ruiz A, Fernández I, Fernández A. Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (Lauraceae) [En línea]. Biochemical Systematics and Ecology. 2016 [Fecha de acceso 26 de septiembre del 2018]; 67:53-57. DOI: 10.1016/j.bse.2016.05.010. Disponible en:
[https://www.researchgate.net/publication/303781783 Phenolic constituents of leaves from Persea caerulea Ruiz Pav Mez Lauraceae](https://www.researchgate.net/publication/303781783_Phenolic_constituents_of_leaves_from_Persea_caerulea_Ruiz_Pav_Mez_Lauraceae)
22. Drago M, López M, Sainz T. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2006; 37(4): 58-68.
23. Moghaddam, M, Mehdizadeh L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In: Mihau A, Holban A, editors. Soft Chemistry and Food Fermentation. Iran: Academic Press; 2017.p.379–419. DOI: 10.1016/b978-0-12-811412-4.00013-8.
24. Cuca L, Mendoza D, Álvarez J, Macías V, Coy E. Actividad acaricida de extractos de lauráceas sobre los ácaros intradomiciliarios *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012; 17(4): 308-319.
25. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem Toxicol. 2008; 46(2): 446-75. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
26. PubChem. beta-Caryophyllene. [base de datos en internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA); 2019. [acceso: 24 de enero de 2020]. PubChem CID: 5281515. Disponible en:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Caryophyllene>
27. Sitarek P, Rijo P, García C, Skala E, Kalembe D, Białas A, Szemraj J, Pytel D, et al. Antibacterial, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Essential Oils from Hairy and Normal Roots of *Leonurus*

- sibiricus* L. and their Chemical Composition. Hiwari [serie en Internet]. 2017 [citado 24 enero 2020]; [aprox. 12 p.]. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2017/7384061>.
28. Glisic SB, Milojevic SZ, Dimitrijevic SI, Orlovic AM, Skala D. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. J. Serb. Chem. Soc. 2007; 72 (4): 311–320. DOI: 10.2298/JSC0704311G.
29. PubChem. Sabinene. [base de datos en internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA); 2019. [acceso: 24 de enero de 2020]. PubChem CID: 18818. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sabinene>
30. Arunkumar R, Ajikumaran S, Bahuleyan K, Subramoniam A. The Essential Oil Constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers, and Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of the Oil. Rec. Nat. Prod. 2014; 8(4): 385-393.
31. PubChem. beta-Farnesene. [base de datos en internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA); 2019. [acceso: 24 de enero de 2020]. PubChem CID: 5281517. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Farnesene>
32. Zhang J-P, Qin Y-G, Dong Y-W, Song D-L, Duan H-X, Yang X-L. Synthesis and biological activities of (E)- β -farnesene analogues containing 1,2,3-thiadiazole. Chinese Chemical Letters. 2017; 28(2): 372–376. DOI: 10.1016/j.cclet.2016.10.030.
33. Sun Y, Qiao H, Ling Y, et al., New analogues of (E)-b-farnesene with insecticidal activity and binding affinity to aphid odorant-binding proteins, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011; 59 (6): 2456–2461. DOI: 10.1021/jf104712c.
34. PubChem. Germacrene D. [base de datos en internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA); 2019. [acceso: 24 de enero de 2020]. PubChem CID: 5373727. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5373727>
35. Noge K, Becerra J. Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus *Bursera* (Burseraceae). Molecules. 2009; 14(12): 5289–5297. DOI:10.3390/molecules14125289.

36. PubChem. Espatulenol. [base de datos en internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA); 2019. [acceso: 24 de enero de 2020]. PubChem CID: 6432640. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Espatulenol>
37. Jayaprakasam B, Alexander-Lindo RL, DeWitt DL, Nair MG. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenae courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. Food Chem. 2007; 105 (2): 485-490. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.004.
38. Ulubelen A, Topcu G, Eris C, Sönmez U, Kartal M, Kurucu S, Bozok-Johansson C. Terpenoids from *Salvia sclarea*. Phytochemistry. 1994; 36(4): 971–974. DOI:10.1016/s0031-9422(00)90474-6.
39. Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. Current Opinion in Toxicology. 2018; 7: 122-126. DOI: 10.1016/j.cotox.2018.01.002.
40. Viada E, Gómez L, Campaña I. Estrés oxidativo. Correo Científico Médico. 2017; 21(1): 171-186.
41. Corrales LC, Muñoz MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 2012; 10 (18): 214-225.
42. Espín S. Biomonitorización de contaminantes ambientales persistentes y evaluación de efectos subletales en aves silvestres: uso de plumas y biomarcadores de estrés oxidativo [Tesis Doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria; 2013.
43. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biology. 2015; 4: 180–183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
44. Lorenzi R. Efeito do Glicolaldeído sobre parametros de estresse oxidativo no rim, fígado e coracao de ratos Wistar [Tesis de magister]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós graduacao em Ciencias Biológicas; 2010.
45. Arango O, Pantoja D, Santa Cruz L, Hurtado A. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del Alto Patia. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2012; 10(2): 79 – 86.

46. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. Annual Review of Biochemistry. 2017; 86(1): 715–748. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
47. Prior R. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am J Clin Nutr. 2003; 78:570S–8S.
48. Cardona LE, Mejía LF. Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*. Biosalud. 2009; 8: 58 – 70.
49. Mohammad S, Mousavi A, De Souza A. Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications. Oxford: John Wiley & Sons Ltd.; 2018.
50. Flores K, Puente MR. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” sobre *Escherichia coli* [Tesis de Título Profesional]. Huancayo: Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad Peruana Los Andes; 2016.
51. García DC. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género *Amaranthus* aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo diciembre de 2013-mayo de 2014 [Tesina de Grado]. Riobamba: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo; 2015.
52. Wińska K, Maczka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative?. Molecules. 2019; 24(11): 2130. DOI: 10.3390/molecules24112130.
53. Priti S, Archana S, Kuma JS. Antimicrobial activity of essential oils against Test Organisms. International Journal of Creative Research Thought (IJCRT). 2018; 6(1): 448-456. DOI: 10.13140/RG.2.2.15170.02244.
54. Man A, Santacroce L, Iacob R, Mare A, Man L. Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. Pathogens. 2019; 8(1): 15. DOI:10.3390/pathogens8010015.
55. Argote-Vega FE, Suarez-Montenegro ZJ, Tobar-Delgado ME, Perez-Alvarez JA, Hurtado-Benavides AM, Delgado-Ospina J. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia*

- coli*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2017; 15(2):52- 60. DOI: 10.18684/bsaa.
56. Zurita S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. Rev. Perú Med Exp Salud Publica. 2018; 35(1):126-131. DOI: 10.17843/rpmesp.2018.351.3563.
 57. Chapoñan A, Leyva K, Meza T. “Características epidemiológicas y clínicas de pacientes hospitalizados con fungemia y exploración de factores asociados con mortalidad, género de hongo y especie de *Candida* en un Hospital de tercer nivel de atención entre los años 2013 al 2017” [Tesis de grado]. Lima: Facultad de Medicina, Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2018.
 58. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horizonte Médico. 2018; 18(1): 75-85. DOI: 10.24265/horizmed.2018.v18n1.11.
 59. Pérez L, Macías J, León A, Alvarado B, Ramírez M, Navarro M, et al. *Candida* y Candidiasis. In: Mora H, Lopes L, editors. Current Progress in Medical Mycology. Springer International Publishing AG; 2017. p. 91-110. DOI: 10.1007/978-3-319-64113-3.
 60. Pineda-Murillo J, Cortés-Figueroa AA, Uribarren-Berrueta T, Castañón LR. Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev. Méd. Risaralda. 2017; 23 (1): 38 – 44.
 61. Ambrosio CMS, de Alencar SM, de Sousa RLM, Moreno AM, Da Gloria EM. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. Industrial Crops and Products. 2017; 97: 128–136. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.11.045.
 62. Ochoa K, Paredes LR, Bejarano DL, Silva RJ. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). Scientia Agropecuaria. 2012; 3(4): 291 – 302.
 63. Al-Jabri NN, Hossain MA. Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. Journal of King Saud University – Science. 2016; 60(30): 1-7. DOI: 10.1016/j.jksus.2016.08.008.
 64. Bassanetti I, Carcelli M, Buschini A, Montalbano S, Leonardi G, Pelagatti P, et.al. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils

- derivatives. Food Control. 2017; 73: 1-7. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.09.010.
65. Montero-Recalde M, Revelo J., Avilés-Esquivel D, Valle E, Guevara-Freire D. Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella. Rev Inv Vet Perú. 2017; 28(4): 987-993. DOI: 10.15381/rivp.v28i4.13890.
66. Schaich KM, Tian X, Xie J. Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays". Journal of Functional Foods. 2015; 18: 782–796. DOI: 10.1016/j.jff.2015.05.024.
67. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology. 2011; 48(4): 412–422. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1.
68. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In: Shalaby E, editor. Antioxidant. London: IntechOpen; 2019. p. 1-28. DOI: 10.5772/intechopen.85270.
69. Juárez J, Castro A, Jauregui J, Lizano J, Carhuapoma M, Choquesillo F. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación. 2010; 13(1): 9-13.
70. The United States Pharmacopeial Convention. <51> Pruebas de eficacia antimicrobiana, <841> Peso específico en The United States Pharmacopeia 42/NF 38 Vol.4. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2019.
71. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol. 1995; 28(1): 25-30. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
72. Re R, Pellegrini N, Protteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999; 26 (9-10): 1231-1237. Citado en PubMed PMID: 10381194.
73. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review [En línea]. J Pharm Anal. 2016 [Fecha de acceso 29

Diciembre del 2019]; 6(2): 71–79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5762448/>

74. Marín D, Ramírez LS. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 2009; 15(42): 263-268.
75. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*. 2003; 88(2-3):199-204. DOI: 10.1016/s0378-8741(03)00212-5.
76. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Test for Bacteria that grow aerobically; Approved Standard- Eleventh Edition. Vol.38, CLSI document M07-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018; 91p.
77. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*. 2016; 38(6): 1015-9. DOI: 10.1007/s10529-016-2079-2.
78. Borra RC, Lotufo MA, Gaglioti SM, Barros F, Andrade PM. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res*. 2009; 23(3):255-262. DOI:10.1590/s1806-83242009000300006.
79. Perrot S, Dutertre-Catella H, Martin C, Rat P, Warnet J. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicological Sciences*. 2003; 72(1):122-129. DOI: 10.1093/toxsci/kfg014.
80. Csepregi R, Lemli B, Kunsági-Máté S, Szenté L, Koszegi T, Némethi B, et.al. Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay?. *Molecules*. 2018; 23(2):382. DOI:10.3390/molecules23020382.
81. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008; 3(2):163-175.
82. Liu M, Seidel V, Katerere D. and Gray A. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007;42(4):325-329.
83. Biesiadecki BJ, Jin JP. A High-Throughput Solid-Phase Microplate Protein-Binding Assay to Investigate Interactions between Myofilament Proteins.

Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011; 52. DOI: 10.1155/2011/421701.

84. Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.* 2004; 18: 435-48. DOI: 10.1002/ptr.1465.
85. Zhang W, Liang X. Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Volatile Components Analysis in *Ipomoea Cairica* (L.) Sweet Leaves: Natural Deep Eutectic Solvents as Green Extraction and Dilution Matrix. *Foods.* 2019; 8(6): 205. DOI: 10.3390/foods8060205.
86. Delgado WA. Estudio de la diversidad química de aceites esenciales y extractos etanólicos de diez especies de Lauraceae colombiana [Tesis doctoral]. Bogotá: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2017.
87. Vélez M, Campos R, Sánchez H. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis Ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 2014; 17(3): 489-499.
88. Suzarte M, Salgueiro M. Essential Oils Chemistry. In: De Sousa D. *Bioactive Essential Oils and Cancer.* Brasil: Springer International Publishing; 2015. p.19-56. DOI: 10.1007/978-3-319-19144-7.
89. Setzer WN., Stokes SL., Penton AF., et al. Cruzain Inhibitory Activity of Leaf Essential Oils of Neotropical Lauraceae and Essential Oil Components [En línea]. *Natural Product Communications.* 2007 [Fecha de acceso 14 de enero del 2019]. 2 (12) :1203-1210. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X0700201202>
90. Paduch R, Trytek M, Król SK, Kud J, Frant M, Kandefer-Szerszeń M, et.al. Biological activity of terpene compounds produced by biotechnological methods. *Pharmaceutical Biology.* 2016; 54(6): 1096-1107. DOI: 10.3109/13880209.2015.1103753.
91. Cabrera R. Rendimiento y caracterización físico-química de perseitol obtenido del exudado de la corteza de *Persea americana* Mill. (Palta) [Tesis de grado]. Trujillo: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica los Ángeles de Chimbote; 2018.
92. Rengifo P. Caracterización del aceite de la semilla de palta *Persea Americana* Mill. Var. Hass fuerte y medición de su actividad antioxidante

[Tesis doctoral]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.

93. Choi HS, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and their components: Detection using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(9): 4156–4161. DOI :10.1021/jf000227d.
94. Olivero J., González T., Güette J., Jaramillo B., Stashenko E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010; 20(4): 568-574.
95. Abramovic H, Grobin B, Poklar N, Cigic B. Relevance and Standardization of In Vitro Antioxidant Assays: ABTS, DPPH, and Folin–Ciocalteu. *Journal of Chemistry*. 2018; 1-9. DOI: 10.1155/2018/4608405.
96. Musa K, Abdullah A, Kuswandi B, Hidayat M. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2013. 141(4): 4102-4106. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.112.
97. Abderrahim A, Belhamel K, Chalard P, Figueredo G. Correlation between chemical composition and antioxidant activity of the essential oils from leaves and berries of *Schinus molle* L. growing in two areas of Bejaia (Algeria). *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2018; 12(2): 1123–1134. DOI :10.1007/s11694-018-9727-2.
98. Granados C, Yáñez X, Acevedo D. Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxyla* de Norte de Santander (Colombia). *Información tecnológica*. 2014; 25(3): 11-16. DOI: 10.4067/S0718-07642014000300003.
99. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2005; 25(4): 726-732.
100. Joshi SC, Verma AR, Mathela CS. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48(1): 37–40. DOI: 10.1016/j.fct.2009.09.011.
101. Silva AC, Lopes P, Azevedo MM, Costa DC, Alviano C, Alviano D. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules*. 2012; 17(6): 6305–6316. DOI:10.3390/molecules17066305.

102. Yang H, Woo J, Pae A, Um M, Cho NC, Park KD, et. al. α -Pinene, a major constituent of pine tree oils, enhances non-rapid eye movement sleep in mice through GABAA-benzodiazepine receptors. *Molecular Pharmacology* [serie en Internet]. 2016 Agos [citado 23 Ene 2020]; 90(5): [aprox. 41p.]. DOI: 10.1124/mol.116.105080. Disponible en : <http://molpharm.aspetjournals.org/content/molpharm/early/2016/08/29/mol.116.105080.full.pdf>
103. Lin GS, Ma CH, Duan WG, Cen B, Lei FH, Yang ZQ. Synthesis and biological activities of α -pinene based dithiadiazoles. *Holzforschung*. 2014; 68(1): 75–83. DOI 10.1515/hf-2013-0006.
104. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, et.al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*.2005; 91(4): 621–632. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.06.031.

11. ANEXOS

ANEXO N°1: Certificado de clasificación taxonómica de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez.

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C.B.P. N° 3796
Tel: 17512863 RPM 963689079



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, **Gina Rossmery Damián Santa Cruz**, Bachiller, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente de bosque premontano del departamento de Amazonas. Provincia. Luya. Distrito de Camporredondo. Localidad Pillas, donde es conocida con el nombre vulgar "junjuli", la muestra fértil con flores y frutos ha sido identificada como ***Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez.** Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Magnoliidae
ORDEN	: Laurales
FAMILIA	: Lauraceae
GENERO	: <i>Persea</i>
ESPECIE	: <i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav.) Mez

Nombres vulgares: "junjuli", "pumapara"




Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 25 de agosto del 2018

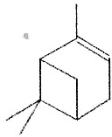
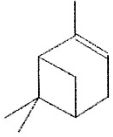

José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

ANEXO N°2: Certificado del Análisis de CG/EM del aceite esencial de *Persea caerulea* (página 1/3 y 4/9)

	UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA FACULTAD DE CIENCIAS LABICER (Laboratorio N° 12) ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN	
INFORME TÉCNICO N° 2303 – 18 – LABICER		
1. DATOS DEL SOLICITANTE		
1.1 NOMBRE DEL SOLICITANTE :	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS	
1.2 R.U.C. :	20148092282	
2. FECHA DE EMISIÓN :	29 / 11 / 2018	
3. ANÁLISIS SOLICITADO :	ANÁLISIS CUALITATIVO DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES GC-MS	
4. DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA SEGÚN EL SOLICITANTE		
4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA :	01 MUESTRA DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav.) Mez	
5. LUGAR DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA :	LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS	
6. CONDICIONES AMBIENTALES :	Temperatura: 23.5°C; Humedad relativa: 65 %	
7. MÉTODO UTILIZADO :	CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	
8. DOCUMENTO DE REFERENCIA :	Bilal Gurbuza, <i>et. al.</i> Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) cultivation studies under Ankara ecological conditions. Industrial Crops and Products 88 (2016) 12–16.	
9. EQUIPOS		
CROMATÓGRAFO DE GASES. SHIMADZU, GC-2010 Plus.		
• Automuestreador: SHIMADZU, AOC-6000.		
• Detector de espectrometría de masas: SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra.		
COLUMNA GC: RESTEK. RTX-5MS, 30m x 0.25 mm ID x 0.25 µm df. Serial: 1346249.		
10. REACTIVOS Y MATERIALES		
• Helio UHP (5.0), ≥99.999%, adquirido de LINDE GAS PERÚ.		
• Acetona P.A., 99.8%, adquirido de MERCK PERUANA.		
• Sulfato de sodio anhidro P.A., ≥99.0%, adquirido de MERCK PERUANA.		
• Filtros de jeringa de Nylon de 25mm de diámetro x 0.45µm, adquirido de RESTEK.		
11. TRATAMIENTO DE MUESTRA		
Se recibió 01 muestra de aceite esencial (descrito en el ítem 4). La muestra se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró usando un filtro de jeringa de 0.45µm.		
Análisis por Inyección Headspace – HS (Componentes más Volátiles) se tomaron 200µL de la muestra filtrada y se colocaron en el vial de HS de 10mL. El vial HS se colocó inmediatamente en el automuestreador del GCMS para su lectura.		
Análisis por Inyección Líquida – LS (Liquid syringe) se diluyó la muestra filtrada en la proporción de 1:100 (v:v) en acetona filtrada y se colocó en un vial. El vial se posicionó inmediatamente en el automuestreador del GCMS para su lectura.		
		
INFORME TÉCNICO N° 2303-18- LABICER		Página 1 de 9
Av. Túpac Amaru 210 Lima 31, Perú. Central: 481 1070 anexo 316. Telefax: 382 0500. E-mail: otilia@uni.edu.pe		

3. RESULTADOS

ACEITE ESENCIAL	COMPONENTE PRINCIPAL	
	Análisis por Inyección Headspace	Análisis por Inyección Líquida
<i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav.) Mez	Alpha-pinene	Alpha-pinene
	 (Abundancia relativa: 37.36%)	 (Abundancia relativa: 15.73%)

NOTA: La lista de compuestos mostrados para cada muestra es el resultado probabilístico obtenido por el software del equipo GCMSsolution de SHIMADZU utilizando la librería NIST. La probabilidad se mide por el SI (Similarity index) que se encuentra en cada espectro de masa (en el texto superior a la gráfica). La lista de componentes detectados en el aceite esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez se encuentran en las Tabla N°1 y 2 del Anexo.

14. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO

El Informe técnico es válido solo para la muestra y las condiciones indicadas en los ítems del uno (1) al cuatro (4) del presente informe técnico.


Bach. Nadia Rodríguez Hamamura
Analista químico
LABICER – UNI



M.Sc. Otilia Acha de la Cruz
Jefa de Laboratorio
Responsable de Análisis
CQP 202

El Laboratorio no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.

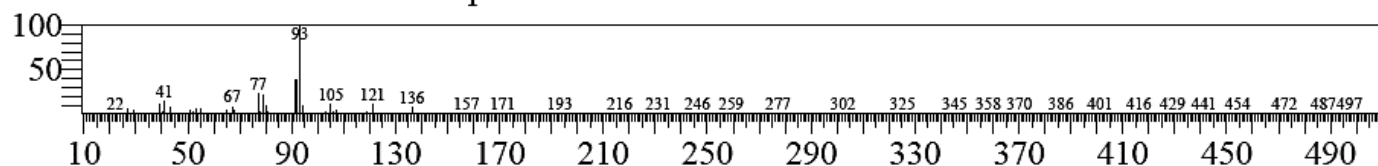
ANEXO N°3: Espectros de masas de los 3 principales componentes del aceite esencial de *Persea caerulea* (alfa pineno, beta pineno y alfa felandreno)

<< Target >>

Line#:5 R.Time:12.380(Scan#:1877) MassPeaks:312

RawMode:Averaged 12.375-12.385(1876-1878) BasePeak:93.10(4345609)

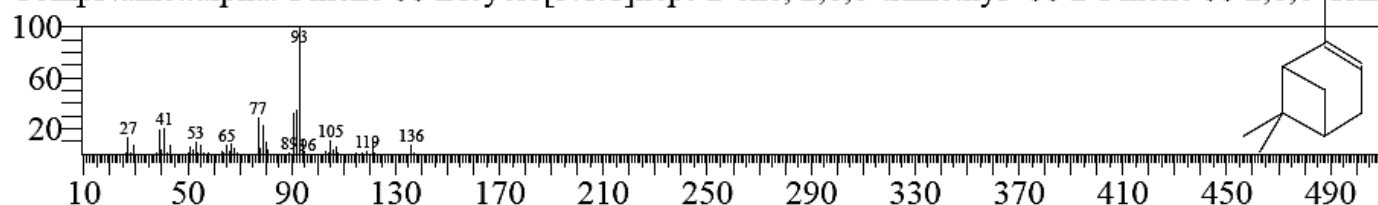
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6850 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:80-56-8 MolWeight:136 RetIndex:948

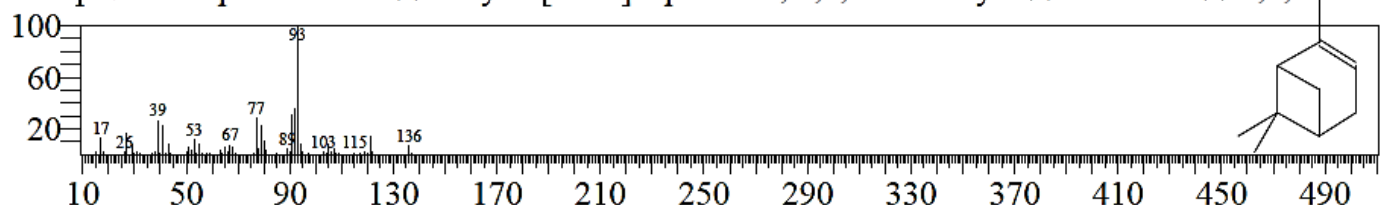
CompName:.alpha.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- \$\$ 2-Pinene \$\$ 2,6,6-Trin



Hit#:4 Entry:6849 Library:NIST14s.lib

SI:93 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:80-56-8 MolWeight:136 RetIndex:948

CompName:.alpha.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- \$\$ 2-Pinene \$\$ 2,6,6-Trin



Hit#:5 Entry:6847 Library:NIST14s.lib

SI:93 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:80-56-8 MolWeight:136 RetIndex:948

CompName:.alpha.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- \$\$ 2-Pinene \$\$ 2,6,6-Trin

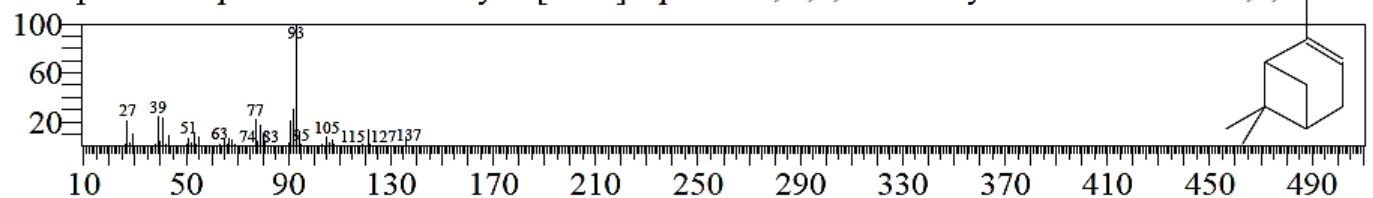


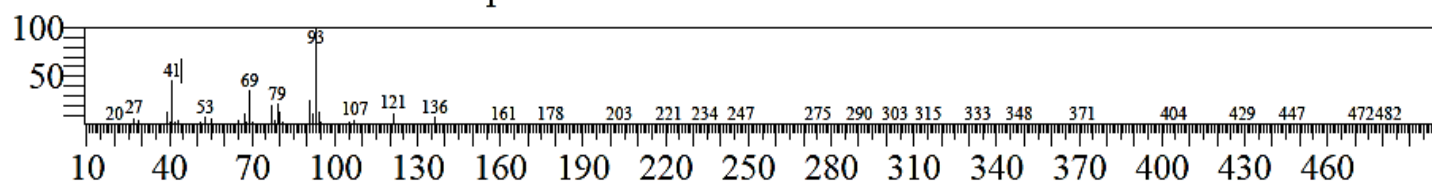
Figura 42. Espectro de masa de la estructura alfa pineno.

<< Target >>

Line#:7 R.Time:16.695(Scan#:2740) MassPeaks:344

RawMode:Averaged 16.690-16.700(2739-2741) BasePeak:93.10(2388781)

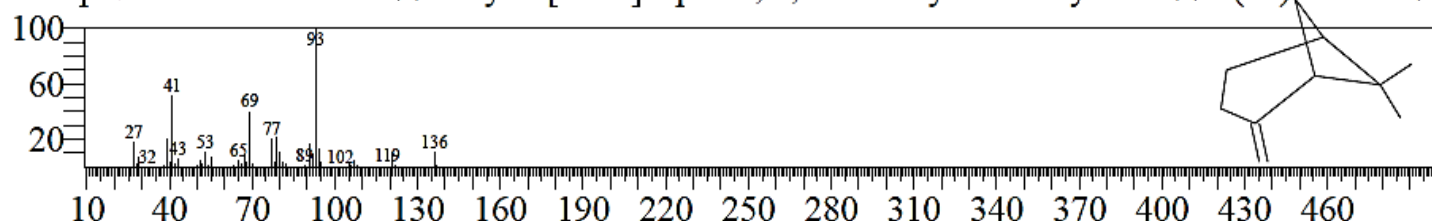
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6809 Library:NIST14s.lib

SI:96 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:127-91-3 MolWeight:136 RetIndex:943

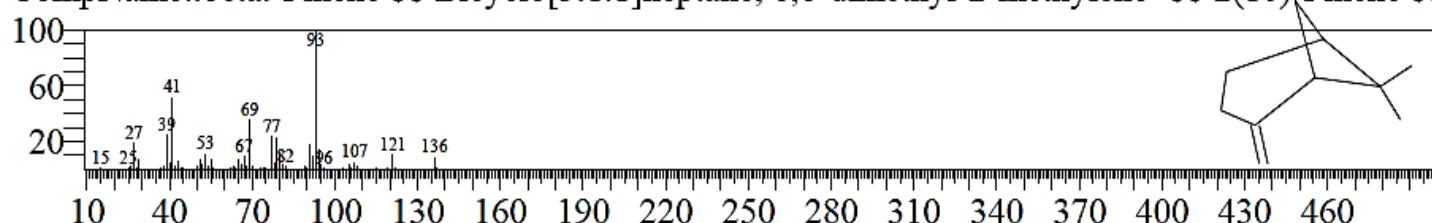
CompName:.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- \$\$ 2(10)-Pinene \$\$



Hit#:2 Entry:6808 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:127-91-3 MolWeight:136 RetIndex:943

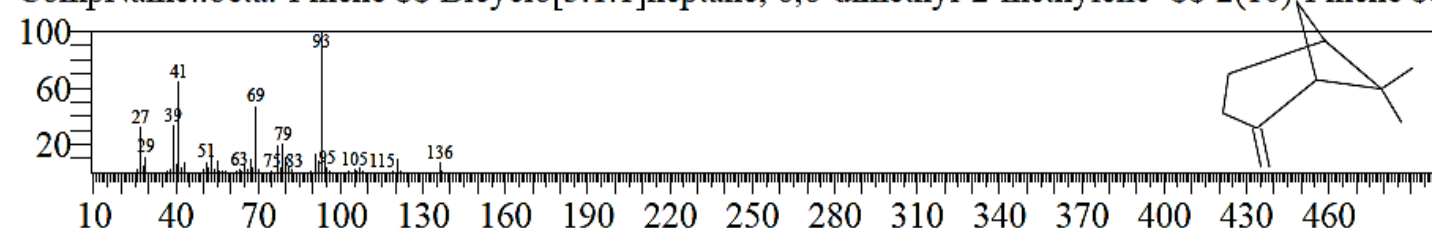
CompName:.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- \$\$ 2(10)-Pinene \$\$



Hit#:4 Entry:6807 Library:NIST14s.lib

SI:91 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:127-91-3 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- \$\$ 2(10)-Pinene \$\$

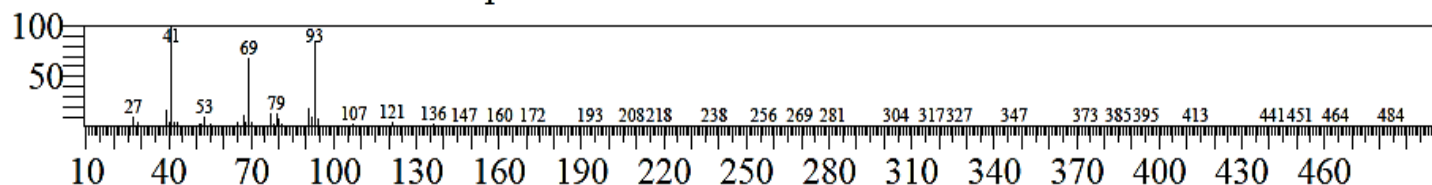


<< Target >>

Line#:8 R.Time:19.085(Scan#:3218) MassPeaks:259

RawMode:Averaged 19.080-19.090(3217-3219) BasePeak:41.00(522968)

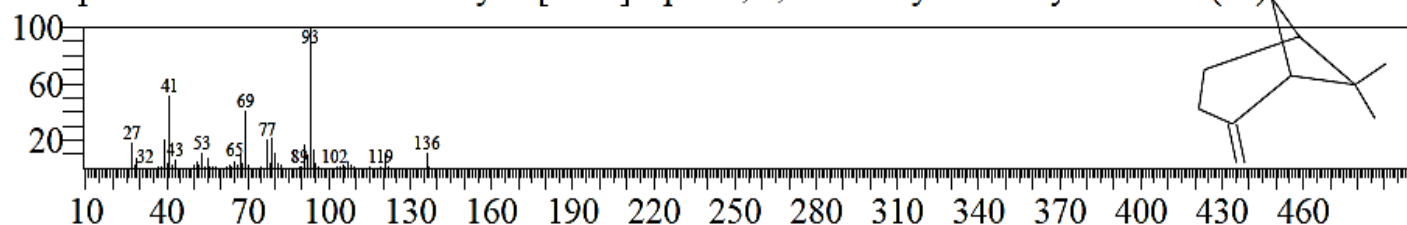
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:4 Entry:6809 Library:NIST14s.lib

SI:89 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:127-91-3 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- \$\$ 2(10)-Pinene \$\$



Hit#:5 Entry:6807 Library:NIST14s.lib

SI:89 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:127-91-3 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- \$\$ 2(10)-Pinene \$\$

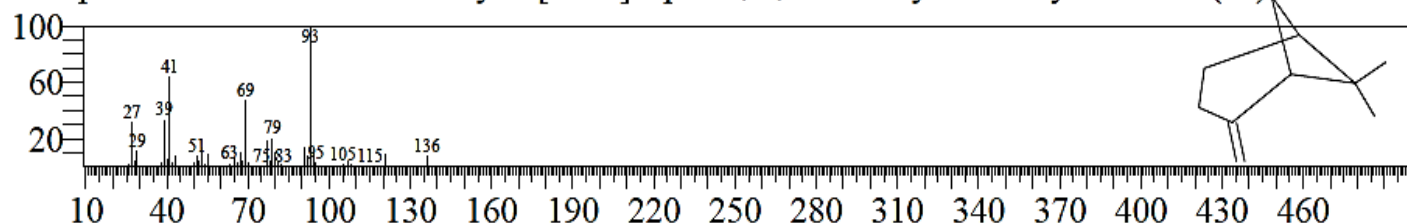


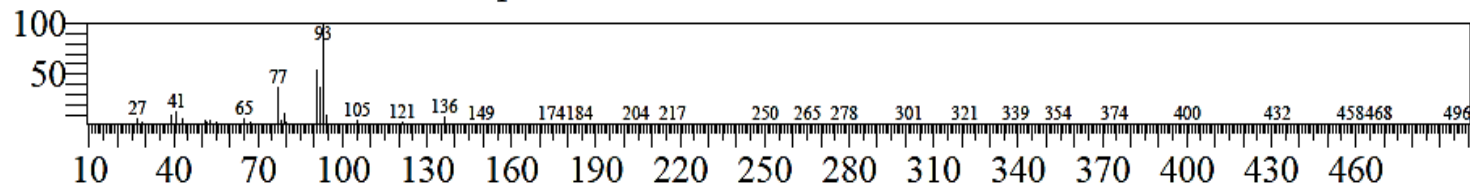
Figura 43. Espectro de masa de la estructura beta pineno.

<< Target >>

Line#:4 R.Time:11.595(Scan#:1720) MassPeaks:260

RawMode:Averaged 11.590-11.600(1719-1721) BasePeak:93.10(386161)

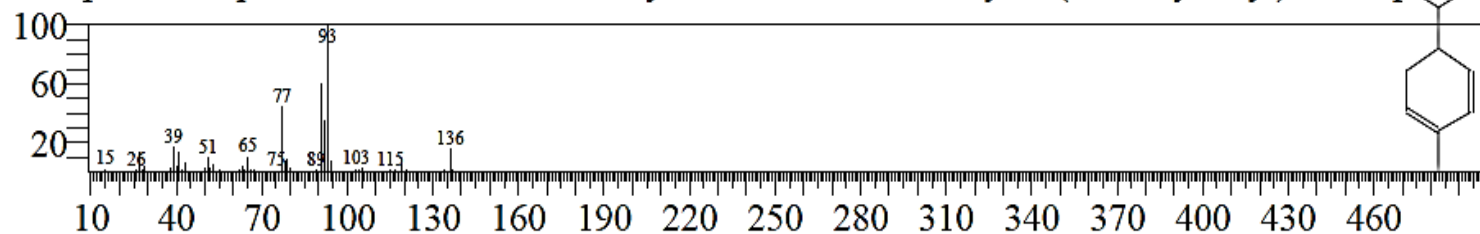
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:3 Entry:6840 Library:NIST14s.lib

SI:94 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:99-83-2 MolWeight:136 RetIndex:969

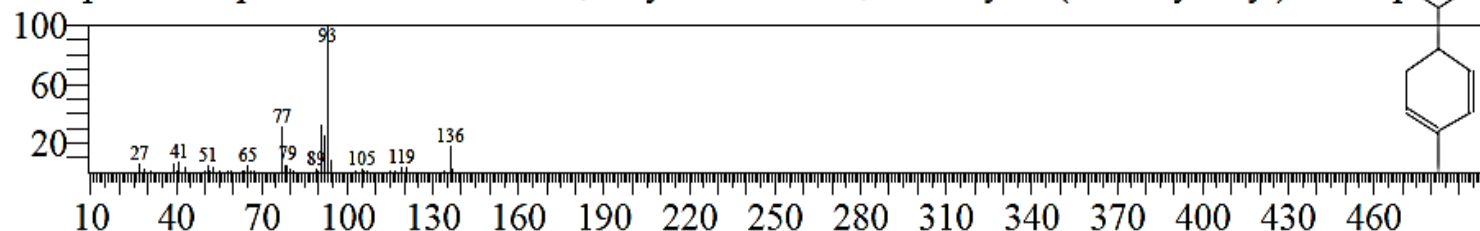
CompName:.alpha.-Phellandrene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$.alpha.-F



Hit#:4 Entry:6839 Library:NIST14s.lib

SI:93 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:99-83-2 MolWeight:136 RetIndex:969

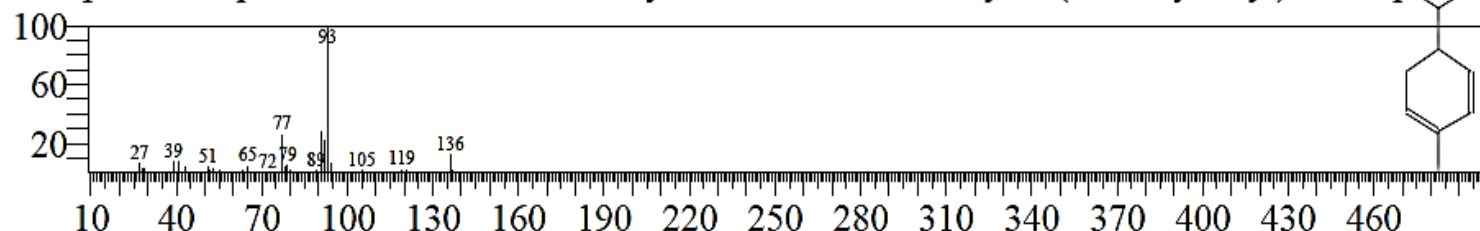
CompName:.alpha.-Phellandrene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$.alpha.-F



Hit#:5 Entry:6841 Library:NIST14s.lib

SI:91 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:99-83-2 MolWeight:136 RetIndex:969

CompName:.alpha.-Phellandrene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$.alpha.-F

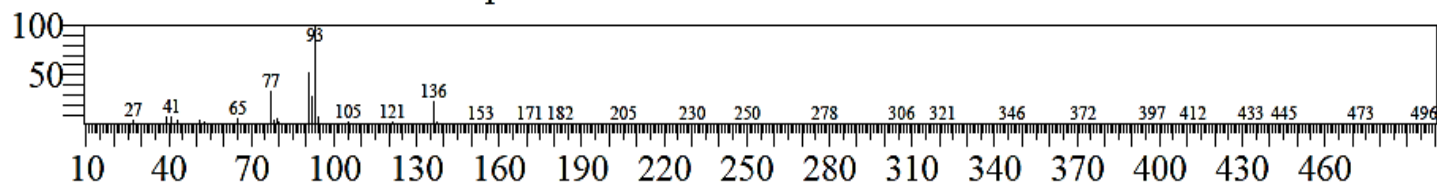


<< Target >>

Line#:9 R.Time:20.740(Scan#:3549) MassPeaks:282

RawMode:Averaged 20.735-20.745(3548-3550) BasePeak:93.10(1934813)

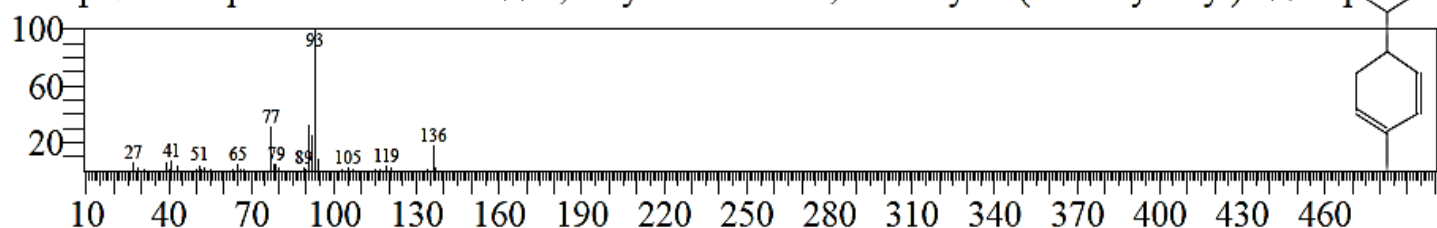
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:6839 Library:NIST14s.lib

SI:95 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:99-83-2 MolWeight:136 RetIndex:969

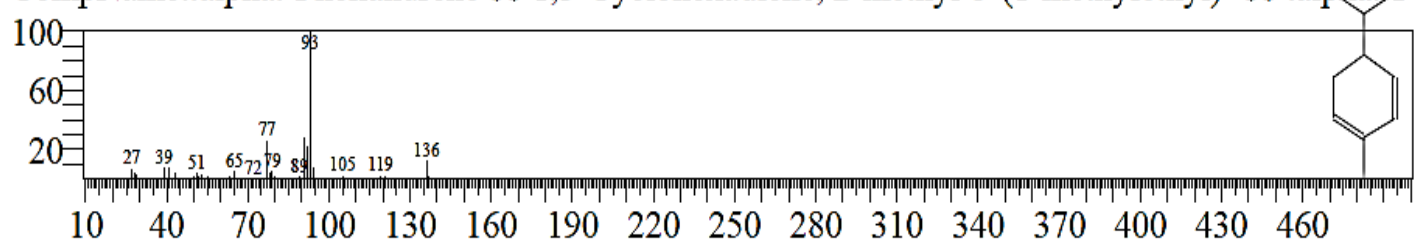
CompName:.alpha.-Phellandrene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$.alpha.-F



Hit#:3 Entry:6841 Library:NIST14s.lib

SI:93 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:99-83-2 MolWeight:136 RetIndex:969

CompName:.alpha.-Phellandrene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$.alpha.-F



Hit#:4 Entry:6840 Library:NIST14s.lib

SI:92 Formula:C₁₀H₁₆ CAS:99-83-2 MolWeight:136 RetIndex:969

CompName:.alpha.-Phellandrene \$\$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$.alpha.-F

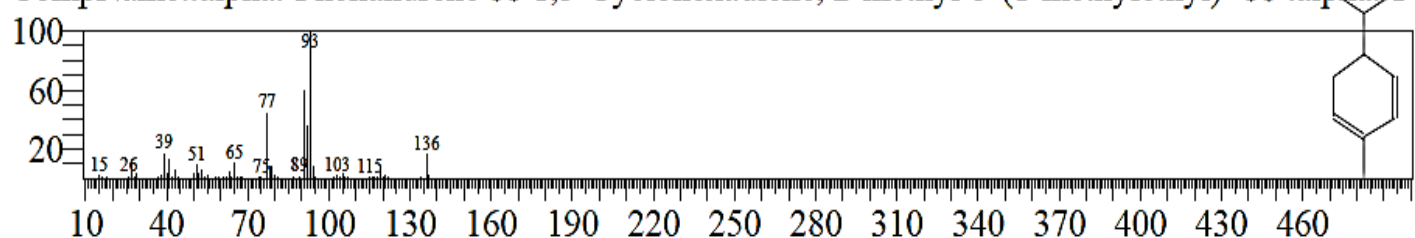


Figura 44. Espectro de masa de la estructura alfa felandreno.

ANEXO N°4: Captación del radical DPPH• del aceite esencial y de Trolox®

Tabla 21. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• del aceite esencial de *Persea caerulea*.

Aceite esencial de <i>P. caerulea</i> (mg/mL)	Promedio de las absorbancias a 517 nm (*)	Desviación estándar del promedio de las absorbancias	% inhibición o %actividad antioxidante DPPH•
0	0.463	0.008	0
1.452	0.430	0.008	7.178
2.903	0.404	0.006	12.764
5.807	0.344	0.010	25.831
11.613	0.206	0.009	55.473
IC ₅₀ (mg/mL)			10.614

*Los resultados indican diferencia significativa, con un nivel de confianza al 95% ($p \leq 0,05$) entre las medias usando el método de Tuckey.

Tabla 22. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH• de Trolox®.

Estándar antioxidante Trolox ® (µg/mL)	Promedio de las absorbancias a 517 nm (*)	Desviación estándar del promedio de las absorbancias	% inhibición o %actividad antioxidante DPPH•
0	0.487	0.002	0
0.417	0.451	0.011	7.373
0.833	0.412	0.005	15.444
1.667	0.329	0.012	32.380
3.333	0.159	0.002	67.347
IC 50 (µg/mL)			2.504

*Los resultados indican diferencia significativa, con un nivel de confianza al 95% ($p \leq 0,05$) entre las medias usando el método de Tuckey.

ANEXO N°5: Captación del radical ABTS^{•+} del aceite esencial y de Trolox[®]

Tabla 23. Porcentaje de inhibición de radicales ABTS^{•+} del aceite esencial de *Persea caerulea*.

Aceite esencial de <i>P. caerulea</i> (mg/mL)	Promedio de las absorbancias a 734 nm (*)	Desviación estándar del promedio de las absorbancias	% inhibición o %actividad antioxidante ABTS ^{•+}
0	0.680	0.008	0
0.544	0.506	0.014	25.528
1.089	0.376	0.009	44.687
2.178	0.130	0.008	80.807
		IC₅₀ (mg/mL)	1.288

*Los resultados indican diferencia significativa, con un nivel de confianza al 95% ($p \leq 0,05$) entre las medias usando el método de Tuckey.

Tabla 24. Porcentaje de inhibición de radicales ABTS^{•+} de Trolox[®].

Estándar antioxidante Trolox [®] (µg/mL)	Promedio de las absorbancias a 734 nm (*)	Desviación estándar del promedio de las absorbancias	% inhibición o %actividad antioxidante ABTS ^{•+}
0	0.688	0.003	0
1	0.591	0.010	14.033
2	0.481	0.016	30.014
3	0.377	0.010	45.210
4	0.265	0.004	61.516
		IC₅₀ (µg/mL)	3.053

*Los resultados indican diferencia significativa, con un nivel de confianza al 95% ($p \leq 0,05$) entre las medias usando el método de Tuckey.

ANEXO N°6: Curva de captación de radicales DPPH• y ABTS•+ de Trolox®

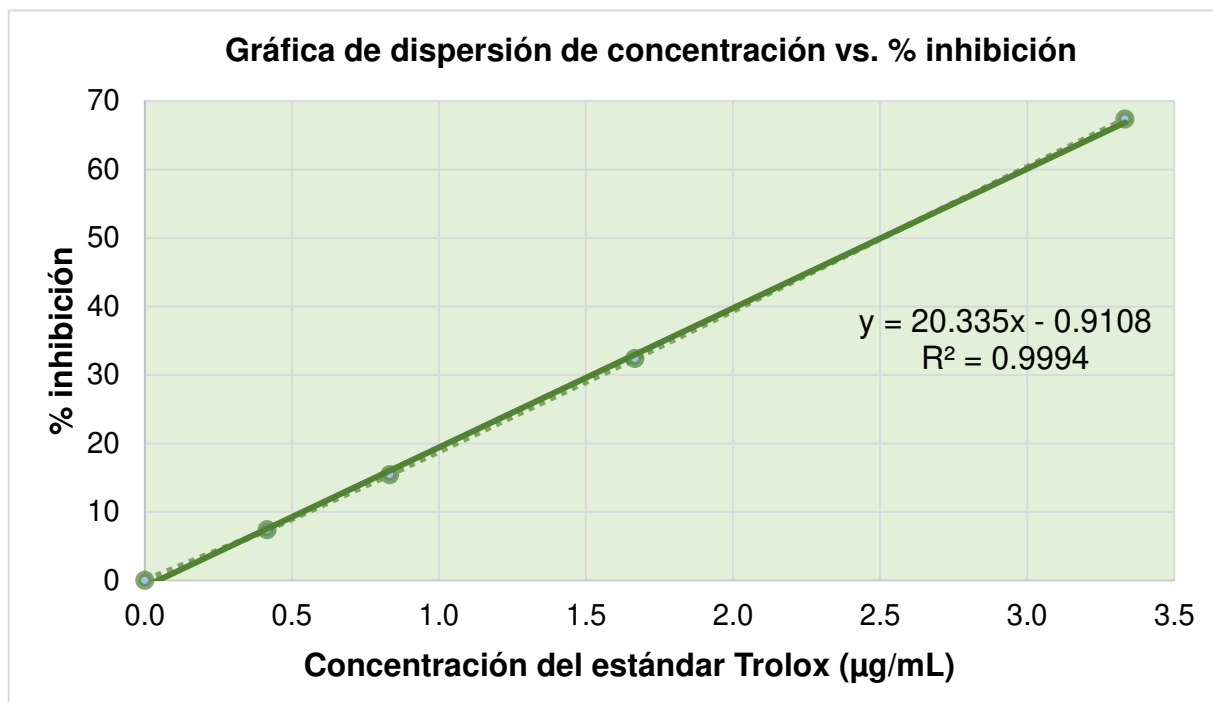


Figura 45. Curva de captación del radical DPPH• de Trolox®.

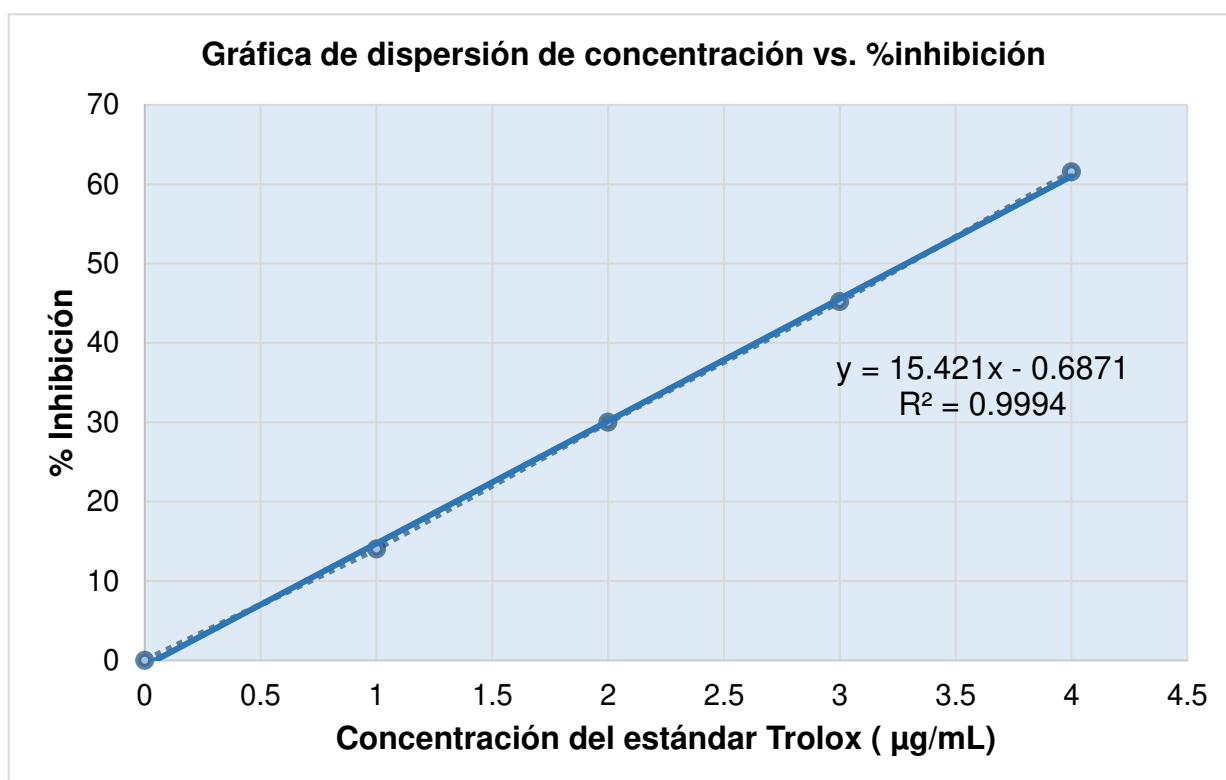


Figura 46. Curva de captación del radical ABTS•+ de Trolox®.

ANEXO N°7: Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método de DPPH• del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea*

ANOVA de un solo factor					
Absorbancias					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,164	4	,041	646,461	,000
Dentro de grupos	,001	15	,000		
Total	,165	19			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancias						
HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Absorbancias	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
,000	1,452	,033000*	,005631	,000	,01561	,05039
	2,903	,059250*	,005631	,000	,04186	,07664
	5,807	,119750*	,005631	,000	,10236	,13714
	11,613	,257000*	,005631	,000	,23961	,27439
1,452	,000	-,033000*	,005631	,000	-,05039	-,01561
	2,903	,026250*	,005631	,002	,00886	,04364
	5,807	,086750*	,005631	,000	,06936	,10414
	11,613	,224000*	,005631	,000	,20661	,24139
2,903	,000	-,059250*	,005631	,000	-,07664	-,04186
	1,452	-,026250*	,005631	,002	-,04364	-,00886
	5,807	,060500*	,005631	,000	,04311	,07789
	11,613	,197750*	,005631	,000	,18036	,21514
5,807	,000	-,119750*	,005631	,000	-,13714	-,10236
	1,452	-,086750*	,005631	,000	-,10414	-,06936
	2,903	-,060500*	,005631	,000	-,07789	-,04311
	11,613	,137250*	,005631	,000	,11986	,15464
11,613	,000	-,257000*	,005631	,000	-,27439	-,23961
	1,452	-,224000*	,005631	,000	-,24139	-,20661
	2,903	-,197750*	,005631	,000	-,21514	-,18036
	5,807	-,137250*	,005631	,000	-,15464	-,11986

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO N°8: Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método de ABTS⁺⁺ del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea*.

ANOVA de un solo factor					
Absorbancias					
	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,483	3	,161	1651,218	,000
Dentro de grupos	,001	8	,000		
Total	,483	11			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Absorbancias	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
,000	,544	,173667*	,008059	,000	,14786	,19947
	1,089	,304000*	,008059	,000	,27819	,32981
	2,178	,549667*	,008059	,000	,52386	,57547
,544	,000	-,173667*	,008059	,000	-,19947	-,14786
	1,089	,130333*	,008059	,000	,10453	,15614
	2,178	,376000*	,008059	,000	,35019	,40181
1,089	,000	-,304000*	,008059	,000	-,32981	-,27819
	,544	-,130333*	,008059	,000	-,15614	-,10453
	2,178	,245667*	,008059	,000	,21986	,27147
2,178	,000	-,549667*	,008059	,000	-,57547	-,52386
	,544	-,376000*	,008059	,000	-,40181	-,35019
	1,089	-,245667*	,008059	,000	-,27147	-,21986

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

ANEXO N°9: Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método de DPPH• del estándar de referencia Trolox®.

ANOVA					
Absorbancia					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,204	4	,051	796,763	,000
Dentro de grupos	,001	10	,000		
Total	,205	14			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Absorbencias	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
,000	,417	,036000*	,006539	,002	,01448	,05752
	,833	,075333*	,006539	,000	,05381	,09685
	1,667	,157667*	,006539	,000	,13615	,17919
	3,333	,328000*	,006539	,000	,30648	,34952
,417	,000	-,036000*	,006539	,002	-,05752	-,01448
	,833	,039333*	,006539	,001	,01781	,06085
	1,667	,121667*	,006539	,000	,10015	,14319
	3,333	,292000*	,006539	,000	,27048	,31352
,833	,000	-,075333*	,006539	,000	-,09685	-,05381
	,417	-,039333*	,006539	,001	-,06085	-,01781
	1,667	,082333*	,006539	,000	,06081	,10385
	3,333	,252667*	,006539	,000	,23115	,27419
1,667	,000	-,157667*	,006539	,000	-,17919	-,13615
	,417	-,121667*	,006539	,000	-,14319	-,10015
	,833	-,082333*	,006539	,000	-,10385	-,06081
	3,333	,170333*	,006539	,000	,14881	,19185
3,333	,000	-,328000*	,006539	,000	-,34952	-,30648
	,417	-,292000*	,006539	,000	-,31352	-,27048
	,833	-,252667*	,006539	,000	-,27419	-,23115
	1,667	-,170333*	,006539	,000	-,19185	-,14881

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO N°10: Análisis estadístico de la actividad antioxidante por el método de ABTS^{••} del estándar de referencia Trolox[®].

ANOVA					
Absorbancia					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,338	4	,084	894,305	,000
Dentro de grupos	,001	10	,000		
Total	,339	14			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia HSD Tukey						
(I) Concentración	(J) Absorbancias	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
,000	1,000	,096667*	,007933	,000	,07056	,12277
	2,000	,206333*	,007933	,000	,18023	,23244
	3,000	,311333*	,007933	,000	,28523	,33744
	4,000	,423000*	,007933	,000	,39689	,44911
1,000	,000	-,096667*	,007933	,000	-,12277	-,07056
	2,000	,109667*	,007933	,000	,08356	,13577
	3,000	,214667*	,007933	,000	,18856	,24077
	4,000	,326333*	,007933	,000	,30023	,35244
2,000	,000	-,206333*	,007933	,000	-,23244	-,18023
	1,000	-,109667*	,007933	,000	-,13577	-,08356
	3,000	,105000*	,007933	,000	,07889	,13111
	4,000	,216667*	,007933	,000	,19056	,24277
3,000	,000	-,311333*	,007933	,000	-,33744	-,28523
	1,000	-,214667*	,007933	,000	-,24077	-,18856
	2,000	-,105000*	,007933	,000	-,13111	-,07889
	4,000	,111667*	,007933	,000	,08556	,13777
4,000	,000	-,423000*	,007933	,000	-,44911	-,39689
	1,000	-,326333*	,007933	,000	-,35244	-,30023
	2,000	-,216667*	,007933	,000	-,24277	-,19056
	3,000	-,111667*	,007933	,000	-,13777	-,08556

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO N°11: Características fenotípicas de los microorganismos

Tabla 25. Descripción de las características fenotípicas de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*

MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS
	RESULTADOS
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Células de color rosa frente al microscopio en tinción gram (bacterias gram negativas). - Colonias rojas con precipitación de sales biliares en el medio Mc Conkey ya que es lactosa positiva. - En medio EMB las colonias presentaron un brillo metálico de color verdoso.
<i>S. aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Células de color violeta frente al microscopio en tinción gram (bacterias gram positivas). -Colonias de color amarillo en el medio Agar Manitol Salado debido a que son coagulasa positiva producen el cambio de color del indicador rojo de fenol. -Positivo a la prueba de catalasa.
<i>C. albicans</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Levaduras gram (+) al observarse células de color azul violeta frente al microscopio en tinción gram. - En agar Sabouraud se observaron colonias blancas cremosas.

ANEXO N°12: Imágenes de parte experimental por el autor.



Figura 47. Planta "junjulí" tomada desde el lugar de recolección.

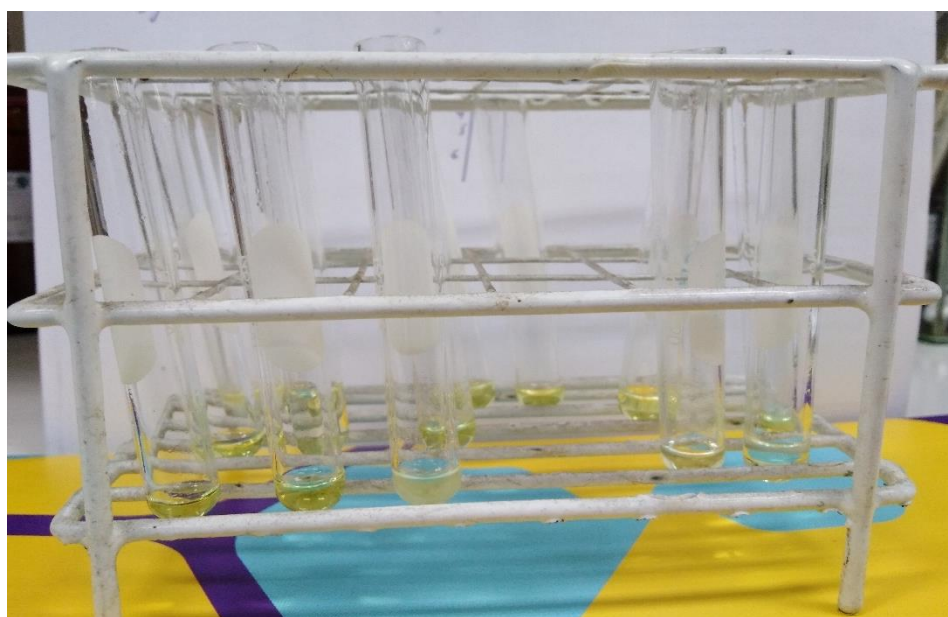


Figura 48. Batería de tubos del ensayo de miscibilidad del aceite esencial.



Figura 49. Batería de tubos para el ensayo de DPPH•.



Figura 50. Batería de tubos para el ensayo de ABTS^{•+}.



Figura 51. Discos de estándares para el método de difusión en agar.



Figura 52. Siembra del inóculo para el método de difusión en agar.



Figura 53. Reactivos empleados en el ensayo de microdilución colorimétrica.



Figura 54. Homogenización para preparación de la muestra de aceite esencial con DMSO.

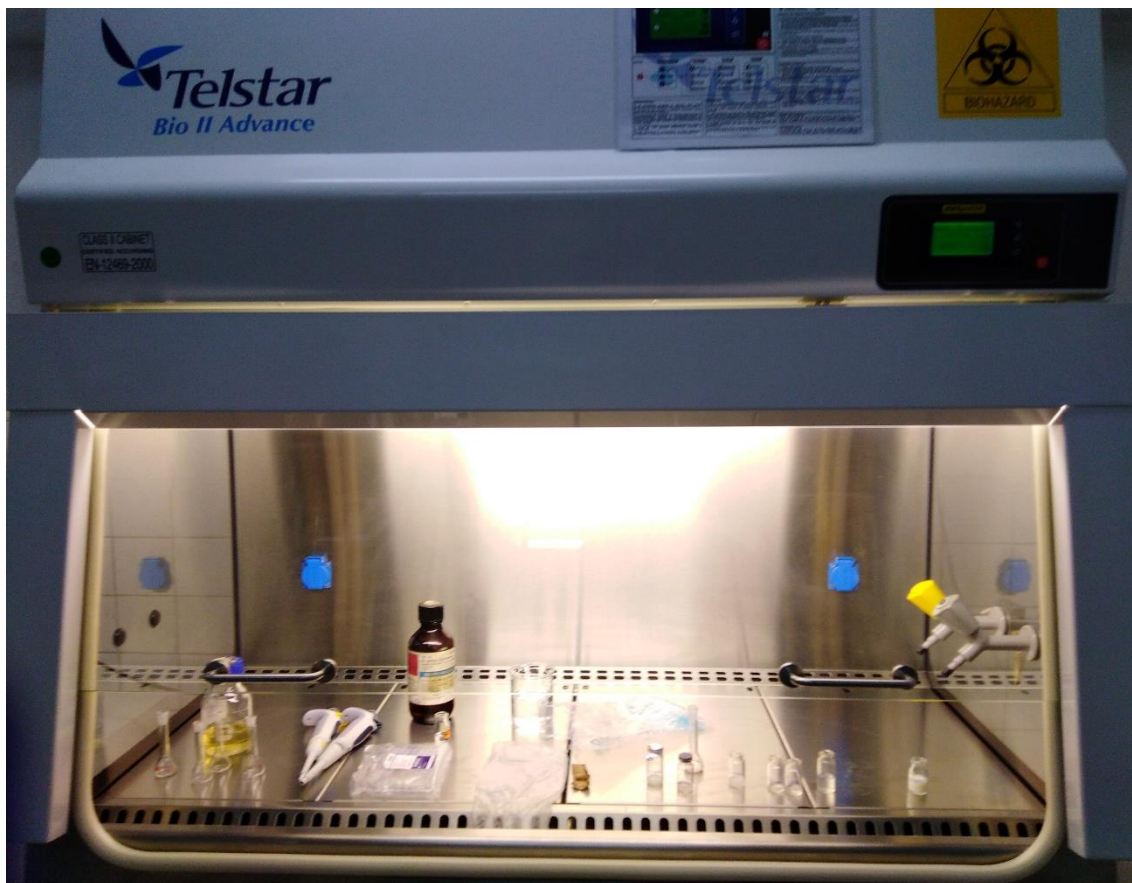


Figura 55. Cabina de flujo laminar con materiales a usarse para el ensayo de microdilución colorimétrica.

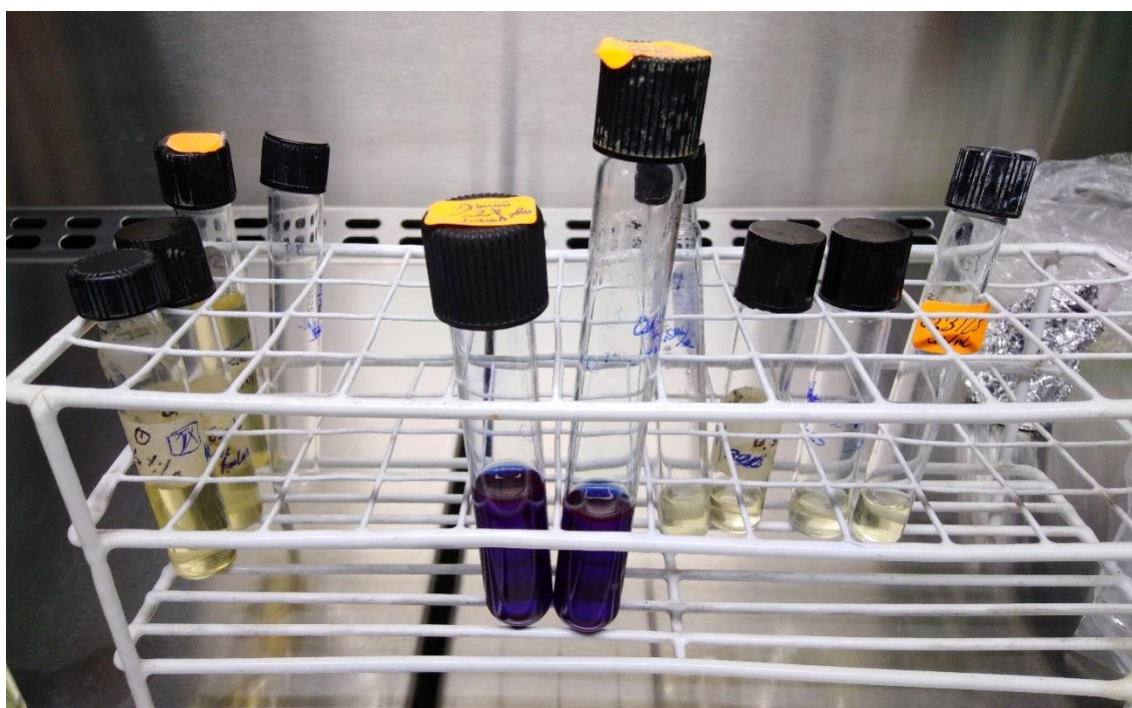


Figura 56. Batería de tubos para el ensayo de microdilución colorimétrica.